

Metodeutvikling for bestemmelse av metall- og metalloksid-nanopartikler i det marine miljø med sp-ICP-MS



Av

André Coetzee Kjærvik

Masteroppgave i miljøkjemi

Kjemisk institutt, Universitetet i Bergen

Havforskningsinstituttet

Februar 2021

Forord

Denne masteroppgaven i miljøkjemi er skrevet i samarbeid med kjemisk institutt ved Universitetet i Bergen (UiB) og Havforskningsinstituttet (HI). Oppgaven ble hovedsakelig gjennomført hos HI, men noe arbeid ble også gjennomført ved geologisk institutt (UiB).

Først og fremst vil jeg takke mine veiledere Stig Valdersnes (HI/UiB) og André Marcel Bienfait (HI) for god veiledning og oppfølging gjennom hele prosjektet. Videre vil jeg takke Berit, Snorri og alle de andre ansatte på laben og prøvemottaket, som har hjulpet til under prosessen med opparbeiding av prøvemateriale og analyse av prøver. En spesiell takk til stipendiat Are Sæle Bruvold (HI/UiB) for lån av blåskjellprøver, elektronmikroskopbilder, og for generelt gode diskusjoner og tips rundt nano-relaterte tema. Videre vil jeg også takke HI for den varme velkomsten og for muligheten til å delta på konferanser. Jeg vil takke alle i kjemimøtene på HI for gode diskusjoner og forslag til oppgaven. En stor takk til EMILAB (geologisk institutt, UiB) for lån av elektronmikroskop, og Irene Heggstad (UiB) for hjelp med manøvrering av elektronmikroskopene.

Til slutt vil jeg takke venner, medstudenter, familie og samboeren min for støtte og oppmuntring gjennom hele prosjektet.

Takk for all støtte og tillit!

André Coetzee Kjærvik

Bergen, februar 2021

Sammendrag

Produksjonen og bruken av materialer i nanoskalaen har økt de siste årene. Hvilken risiko nanomaterialer utgjør på miljøet og biota er ukjent. Det er derfor behov for metodikk som kan detektere og kvantifisere nanomaterialer i biologiske prøver og i prøver fra miljøet. I denne oppgaven er det blitt arbeidet med å utvikle metodikk for å bestemme nanopartikler (NPer) av metall- og metalloksider i modellmatrisen blåskjell ved bruk av enkeltpartikkel induktivt koblet plasma massespektrometri (sp-ICP-MS). Elektronmikroskop er også blitt benyttet som en komplementær-teknikk for en ytterligere karakterisering av NPene.

I prosjektet er det blitt jobbet med metalloksid-NPer av ZrO_2 på <100 nm, CuO på <50 nm, ZnO på <100nm, CeO_2 på 30-50nm og <50 nm. Blåskjell er også blitt analysert for metall-NPer av Zr og Ce. Metalloksid-NPene ble først og fremst bestemt i prøver uten matriser, NPene som viste mest lovende resultater ble videre bestemt i prøver med matriser, hvor blåskjell ble brukt som modellorganisme. For noen NPer ble det også utforsket om enkelte stabilisatorer kunne føre til bedre resultater. I konsentrasjonsområdet det ble arbeidet i, viste ZnO NPene på <100 nm å løse seg opp. Størrelsen til CuO NPene på <50 nm viste seg å dekke et stort størrelsesområde, hvor et fåtall store NPer på over 300 nm førte til en høy variasjon mellom paralleller. Bruk av stabilisatorene PVP-10, PVP-40, natriumsitrat og sitronsyre virket ikke til å forbedre resultatene for CuO NPene. CeO_2 NPer på <50 nm ga lave målinger og få NPer ble funnet med metoden. Bestemmelsen av 30-50 nm CeO_2 NPer og <100 nm ZrO_2 NPer ga bedre resultater knyttet til mengden NPer funnet. Bruk av 2,5% eddiksyre som stabilisator for 30-50 nm CeO_2 NPene forbedret ikke målingene, men ved å fortynne ZrO_2 NPer i 0,1% natriumsitrat ble resultatene bedre for disse NPene. ZrO_2 NPer spiket i blåskjell viste en høy variasjon i gjenvinningsresultatene. CeO_2 NPene på 30-50 nm spiket i blåskjell viste mer reproducerbare resultater enn ZrO_2 NPene.

I oppgaven ble det også undersøkt om det var variasjoner i mengden Ce og Zr NPer/partikler i blåskjell fra fire ulike steder. For Ce NPene/partiklene var det indikasjoner til variasjon mellom de ulike geografisk lokasjonene, men dette ble ikke observert for Zr NPene/partiklene.

Forkortelser

NP: Nanopartikkel

TEM: Transmisjonselektronmikroskop

SEM: Sveipeelektronmikroskop

ICP-MS: Induktivt koblet plasma massespektrometri

sp-ICP-MS: Enkeltpartikkel induktivt koblet plasma massespektrometri

LOD: Deteksjonsgrense

LOQ: Kvantifiseringsgrense

MU: Måleusikkerhet

SD: Standardavvik

RSD: Relativt standardavvik

m/z : Masse til ladningsforhold

NOM: Naturlig organisk materiale

TE: Transporteffektivitet

CPS: Tellinger per sekund

ANOVA: Variansanalyse

ROS: Reaktive oksygenforbindelser

Innhold

Forord	2
Sammendrag	3
Forkortelser	4
1. Innledning.....	7
1.1 Bakgrunn	7
1.2 Målsetning	8
2. Teoretisk bakgrunn.....	9
2.1 Spormetaller.....	9
2.2 Nanopartikler	10
2.3 Blåskjell	19
2.4 Analyseteknikker	22
3. Eksperimentelt og metode	34
3.1 Kjemikalier og utstyr	34
3.2 Tillaging av blåskjellprøver	36
3.3 Enzymbehandling	37
3.4 Tillaging av stabiliserte og ustabiliserte NP-stamsuspensjoner	39
3.5 Bestemmelse av nanopartikler ved sp-ICP-MS	41
3.6 Behandling av data fra sp-ICP-MS	46
3.7 Analyse av nanopartikler med elektronmikroskop (SEM og TEM).....	48
3.8 Kvalitetssikring og kvalitetskontroll	49
3.9 Formler	50
3.10 Statistiske metoder.....	51
4. Resultater.....	52
4.1 Gull 60 nm nanopartikler.....	52
4.2 Sink(II)oksid <100 nm nanopartikler	58
4.3 Cerium(IV)oksid <50 nm og 30-50 nm nanopartikler.....	58

4.4 Kobber(II)oksid <50 nm nanopartikler.....	65
4.5 Zirkonium(IV) oksid nanopartikler <100 nm.....	70
4.6 Zirkonium og cerium nanopartikler i blåskjell.....	75
5. Diskusjon.....	79
5.1 sp-ICP-MS metoden og opparbeiding av suspensjoner av nanopartikler.....	79
5.2 Gull 60 nm nanopartikler.....	80
5.3 Kobber(II)oksid <100 nm nanopartikler.....	82
5.4 Sink(II)oksid <100 nm nanopartikler.....	84
5.5 Cerium(IV)oksid <50 nm og 30-50 nm nanopartikler.....	85
5.6 Zirkonium(IV)oksid <100 nm nanopartikler.....	86
5.7 Nanopartikler i blåskjell.....	88
6. Konklusjon.....	95
7. Videre arbeid.....	96
8. Referanseliste.....	97
9. Vedlegg.....	107

1. Innledning

1.1 Bakgrunn

Når et materiale har dimensjoner i nanoskalaen (1-100 nm) kan materialets egenskaper bli størrelsesavhengig, og egenskapene kan skille seg betraktelig fra det samme materiale i bulkform eller molekyl-/ioneform. Eksempelvis kan det høye overflate til volum-ratioen hos nanomaterialer føre til en økt reaktivitet (De Mello Donega, 2014). Som følge av deres unike egenskaper, benyttes nanomaterialer i mange ulike industrielle og kommersielle sektorer (Walbruck, Kuellmer, Witzleben, & Guenther, 2019) Produksjonen og bruken av materialene har økt betydelig de siste årene (Keller, McFerran, Lazareva, & Suh, 2013) og veksten til industrien har skapt bekymringer tilknyttet potensielle utslipp til miljøet og deres effekt på biota (Batley, Kirby, & McLaughlin, 2013). Ved økt bruk av disse materialene vil trolig mengden sluppet ut til marine miljø øke (Baker, Tyler, & Galloway, 2014). Risikoen nanopartikler (NPer) utgjør er usikker (Wiesner, Lowry, Alvarez, Dionysiou, & Biswas, 2006), men det er blitt påpekt at enkelte NPer etter opptak kan forflytte seg i kroppen (Hillyer & Albrecht, 2001), tas opp i celler (Sung et al., 2018) og indusere oksidativt stress (Horie & Fujita, 2011).

Med den utstrakte bruken av nanomaterialer og den usikre effekten materialene kan ha på det marine miljøet, er det behov for analytiske metoder som kan detektere og kvantifisere NPer i miljøet i relevante konsentrasjoner. Enkeltpartikkel induktivt koblet plasma massespektrometri (sp-ICP-MS) er en lovende teknikk for å både detektere og kvantifisere NPer i biologiskmateriale og generelt i prøver fra miljøet. Med teknikken kan man bestemme grunnstoffet, partikkelantallet og massekonsentrasjonen til partiklene i en prøve. Partikkelens massekonsentrasjon kan også omregnes til størrelsen til partiklene, dersom partiklenes grunnstoffsammensetning og tetthet er kjent eller antatt. Ved analyse av prøver får man også totalkonsentrasjonen av grunnstoffet, som inkluderer analytten i oppløst- og partikkelform (Laborda, Bolea, & Jimenez-Lamana, 2016). Havforskningsinstituttet har tidligere utviklet og validert metodikk for bestemmelse av Au og Ag NPer i blåskjell med sp-ICP-MS. Mye av arbeidet i denne oppgaven vil være en fortsettelse av dette arbeidet ved å utvikle metodikk for bestemmelse av metall- og metalloksid-NPer i marine prøver.

I prosjektet er det blitt arbeidet med metalloksid-NPer av ZnO, CeO, CuO og ZrO, mens metall-NPer av Zr og Ce har også blitt bestemt i blåskjell. Metalloksid NPer utgjør en stor andel av produserte NPene på markedet (Zhang, Pu, Du, Chen, & Jiang, 2016). CeO₂ og ZnO er av relevans ettersom de er blant de mest brukte metalloksid-NPene (Labille & Bottero, 2011), hvor CeO₂ benyttes b.la. som tilsetningsstoff i drivstoff (Reed et al., 2014), mens ZnO benyttes i solkrem (McIntyre, 2012). CuO er også av relevans for sin rapporterte toksisitet (Karlsson, Cronholm, Gustafsson, & Möller, 2008), det er også en forventet produksjon og utslipp av materialet til miljøet (Keller et al., 2013). ZrO₂ NPer blir ansett som et passende materiale for metodeutviklingsformål på grunn av ZrO₂ sin lave reaktivitet (Bandara et al., 2017).

I denne oppgaven benyttes blåskjell som en modellorganisme for ekstraksjon og bestemmelse av NPer. Mange muslingarter er ideelle for overvåkning av miljøet ettersom de har en stor geografisk utbredelse, flytter lite på seg og kan biokonsentrere forurensninger fra miljøet (Cubero-Leon & Ciocan, 2013). Det er også blitt vist at filterspisende skjellarter kan ta opp enkelte NPer (Conway, Hanna, Lenihan, & Keller, 2014; Doyle, Ward, & Mason, 2016) hvor det påpekes at de tas opp mest effektivt i agglomerert form (Ward & Kach, 2009). Med NPer tendens til å danne agglomerater i marint vann (Garner & Keller, 2014) kan filterspisende arter være spesielt utsatt (Galocchio et al., 2020).

1.2 Målsetning

Hovedmålet med denne oppgaven har vært å utvikle metodikk for å bestemme metall- og metalloksid-NPer i marine prøver ved bruk av sp-ICP-MS. Det første steget i bestemmelsen av NPene var å undersøke hvorvidt man klarer å bestemme NPene i prøver uten matriks. Det neste steget var å undersøke om man klarer å ekstrahere og bestemme NPer spiket i blåskjell. Et delmål i metodeutviklingen var å undersøke om enkelte stabilisatorer kan gi bedre resultater ved bestemmelse av NPene. Et annet delmål i utprøvingen av metodikken var å undersøke om man klarer å bestemme innhold av NPer i blåskjell og om det var geografiske forskjeller i NP-innhold i blåskjellene.

2. Teoretisk bakgrunn

2.1 Spormetaller

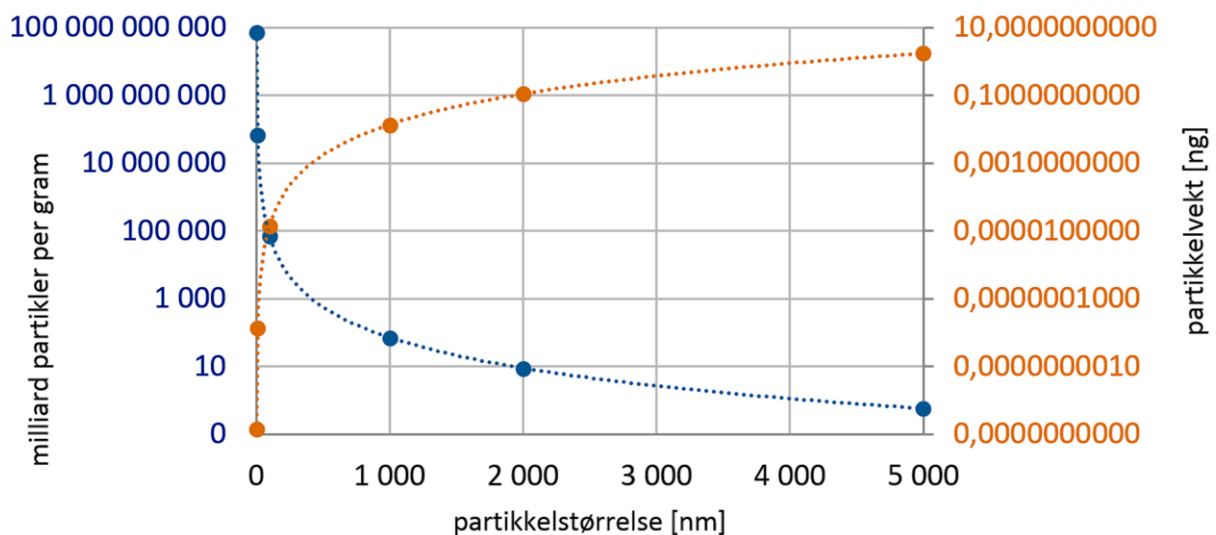
Implisitt av navnet, er spormetaller metaller som finnes i «spor»-mengder i miljøet (Rainbow, 2018), massefraksjonen vil da typisk være i ppm-området og nedover (Duffus, 2002). Enkelte benytter begrepet som et samlebegrep for metaller som interagerer i spormengder med organismer og er toksiske over en gitt grense. Enkelte spormetaller er essensielle for organismer ved lave konsentrasjoner, men har toksiske effekter ved høye konsentrasjoner (Rainbow, 2018). Eksempler på essensielle metaller er Co, Ni, Zn, Cr, Cu og Fe. Andre metaller klassifiseres som ikke-essensielle og har ingen kjente positive biologiske funksjoner, eksempler på slike metaller er: Ag, Al, Cd, Au, Pb og Hg (Bruins, Kapil, & Oehme, 2000). Metaller er grunnstoff som finnes naturlig og vil sirkulere mellom ulike miljøer. Man finner metaller eksempelvis i jordskorpen, og erosjon av jordskorpen vil kunne frigi metaller til marine miljø (Rainbow, 2018). Metaller hentes også naturlig ut av dype reservoarer via vulkaner og hydrotermiske kilder. Transporten av metaller fra terrestriske miljøer til marine miljø skjer via bl.a. avsetning fra atmosfæren, elveutslipp og grunnvann. Menneskelig aktivitet som gruvedrift og utvinning av fossilt brensel har økt utslippet av metaller til marine miljø og atmosfæren (Mason, 2013). Antropogene kilder til spormetaller i marine økosystem er eksempelvis avløpsvann (As, Cr, Cu, Mn og Ni), brenning av kull (As, Hg, og Se) samt utslipp i forbindelse med produksjon av ulike metaller (Cd, Ni, Pb, Se, Cr, Mo, Sb og Zn) (Nriagu & Pacyna, 1988).

Enkelte spormetaller kan akkumuleres i organismer, noe som utgjør en potensiell risiko for mennesker dersom organismene brukes som mat og spises (Copat et al., 2013). Enkelte metaller kan gi toksiske- (akutte, kroniske, subakutte), nevrotoksiske-, karsinogene-, mutagene- og teratogene effekter (Mohammed, Kapri, & Goel, 2011), men om metallene vil gi toksisk effekt er avhengig av dosen man blir utsatt for (Stankovic, Jovic, Stankovic, & Katsikas, 2011). I dette prosjektet ble det arbeidet med metaller av Zr og Ce, samt metalloksider av CuO, ZrO₂, CeO og ZnO. I sjøvann finnes disse metallene i konsentrasjoner i områdene: 0,03 – 0,29 µg/L for Cu, 0,003 – 0,59 µg/L for Zn (Mason, 2013), 0,015-0,05 µg/L for Zr og 0,7 ng/L for Ce (Kabata-Pendias & Szteke, 2015).

2.2 Nanopartikler

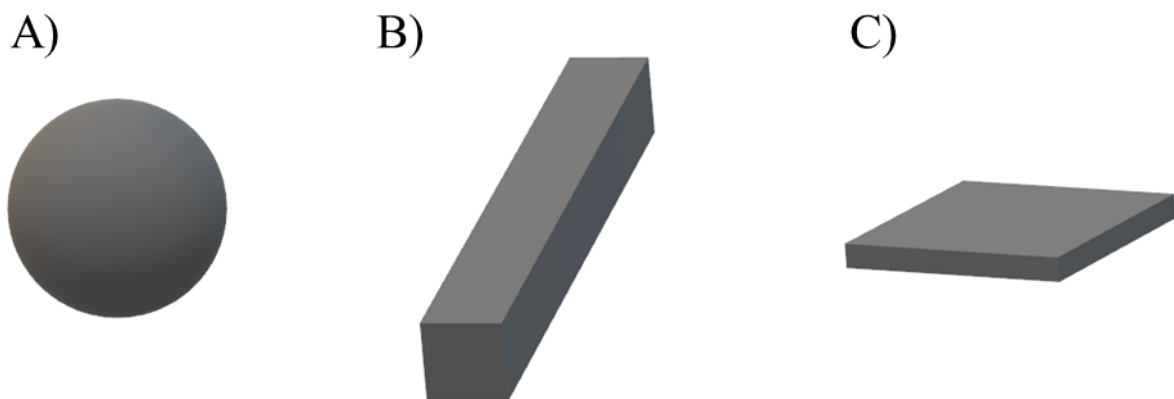
2.2.1 Definisjonen av nanomaterialer

Nanomaterialer blir av EU definert som et materiale som inneholder partikler i en ubundet tilstand eller i form av et aggregat eller et agglomerat, hvor minst 50% av partiklene har en eller flere dimensjoner på 1 – 100 nm. Materialene kan ha blitt laget ved uhell eller med hensikt — de kan også ha et naturlig opphav. Videre defineres aggregater som partikler som er dannet av flere partikler som er sterkt bundet sammen, mens agglomerater defineres som en samling av partikler eller aggregater som er svakt bundet til hverandre (European Commission, 2011). Ettersom begrepene aggregering og agglomerering benyttes mye om hverandre (Nichols et al., 2002), blir begrepet agglomerering benyttet i denne oppgaven for å beskrive partikler som består av flere partikler bundet sammen. Mange materialer vil potensielt kunne bli definert som et nanomateriale ettersom EU-definisjonen er styrt av størrelsesfordelingen til partikkelantallet. Mindre partikler har en lav masse, dette gjør at en liten massefraksjon av et materiale kan bestå av et høyt antall små partikler (se figur 2.1). Følgelig kan en liten massefraksjon av et materiale gjøre at materialet blir definert som et nanomateriale dersom fraksjonen inneholder mange små partikler.



Figur 2.1 Sammenheng mellom partikkelstørrelse, vekt og antall partikler. Blå: Partikkelantall per gram i milliard; oransje: vekt per partikkel i nanogram (sfæriske partikler med en tetthet av $2,65 \text{ g/cm}^3$). Y-aksene er log-skalerte. (skjerm dump (Biefait et al., 2020))

Nanomaterialer kan komme i alle tenkelige geometriske former (Hornyak, Tibbals, Dutta, & Moore, 2009). Materialene kan klassifiseres ut i fra dimensjonene deres hvor de deles inn i null-, en- eller to-dimensjonale nanomaterialer (figur 2.2). Null-dimensjonale nanomaterialer er mindre enn 100 nm i alle retninger (f.eks. nanopartikler og nanoporer), en-dimensjonale er mindre enn 100 nanometer i to retninger (f.eks. nanostenger), to-dimensjonale er under 100 nm i tykkelsen (f.eks. nanoplater) (De Mello Donega, 2014). I dette prosjektet betegnes nanomaterialene vi analyseres som nanopartikler (NPer), hvor vi antar en sfærisk form på partiklene.



Figur 2.2 illustrasjon av nanomaterialer som er null-dimensjonale (A), en-dimensjonale (B) og to-dimensjonale (C) inspirert av (Hornyak et al., 2009)

2.2.2 Nanomaterialers fysiske og kjemiske egenskaper

Når en av dimensjonene til et materiale forekommer i nanoskaladimensjonen (1-100 nm) blir egenskapene til materialet størrelsesavhengig, og følgelig kan egenskapene skille seg fra egenskapene til det samme materialet i bulk form (De Mello Donega, 2014). I nanoskalaen blir oppførselen til materialet endret som følge av to faktorer: overflate til volum ratioen og kvanteffekter (Kumar & Kumbhat, 2016). Overflate til volum ratioen har en stor effekt på egenskapene til et materiale ettersom atomene på overflaten skiller seg fra atomene inni et materiale. Atomene på overflaten av et materiale har færre naboatomer og får dermed ytre orbitaler som ikke er fylt opp (De Mello Donega, 2014). Orbitalene som ikke er fylt opp fører til en økning av overfaltenenergien hos materialet (Cademartiri & Ozin, 2009). Endringen i overflate til volum ratioen kan derfor f.eks. resultere i både endring av smelte- og kokepunkt samt endring av reaktiviteten til materialet (De Mello Donega, 2014). Materialer i nanoskaladimensjonen har økt overflate til volum ratio i forhold til materialet i bulkform,

eksempelvis vil en kube på 1 cm^3 ha 2 ppm av atomene sine på overflaten, mens en kube på 1 nm^3 vil ha 78% av atomene sine på overflaten (Chin, Sow, & Wee, 2010).

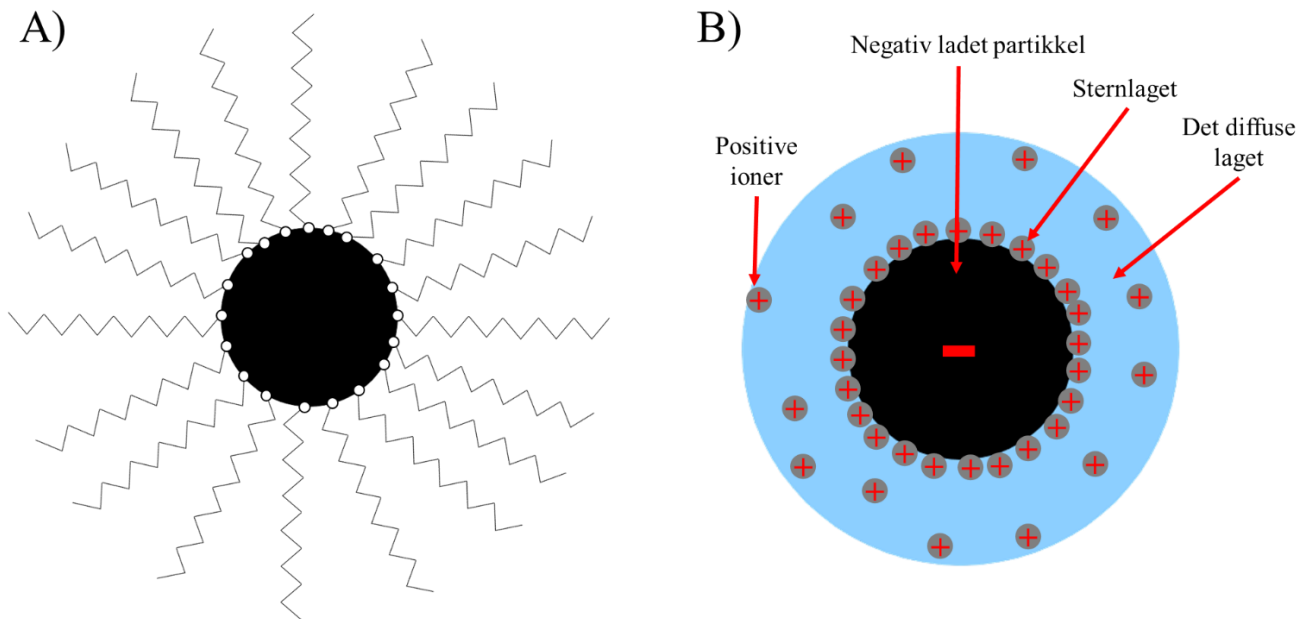
Kvanteeffekter vil i større grad styre egenskapene til materialet når det opptrer i nanoskala, og optisk, elektrisk og magnetisk oppførsel til materialene kan påvirkes (Kumar & Kumbhat, 2016). Et eksempel på dette er Au NPer som endrer farge som følge av både størrelse og form (Goesmann & Feldmann, 2010). Formen til nanomaterialer kan påvirke mange av egenskapene. Formen er blant annet med på å styre hvor stor overflate nanomaterialene har. En kube vil for eksempel ha en større overflate enn en sfære dersom volumet deres er likt (Hornyak et al., 2009). Narayanan og El-Sayed (2004) demonstrerte også at den katalytiske aktiviteten til nanomaterialer kan påvirkes av formen. De viste at Pt kolloider med former som hadde større andel kanter og hjørner var mer katalytisk aktive enn former med mindre kanter og hjørner. Hjørner og kanter har lokalt høy energi ettersom at disse områdene har en større tetthet av ytre orbitaler som ikke er fylt opp. Dette gjør at f.eks. krystallvekst, katalytisk aktivitet og kjemiske reaksjoner fortrinnsvis skjer på hjørner og kanter (Cademartiri & Ozin, 2009).

2.2.3 Stabiliteten til nanopartikler

Kolloidale dispersjoner er systemer hvor materialer (partikler eller dråper) med dimensjoner på $1 \text{ nm} - 1 \text{ }\mu\text{m}$ er dispergert i et medium av gass, væske eller fast stoff (Kontogeorgis & Kiil, 2016). En stabil dispersjon av NPer i en væske kan bli betegnet som en kolloidal dispersjon (Handy et al., 2008).

Uten en form for stabilisering kan NPer i suspensjoner agglomerere og sedimentere. (Auffan et al., 2011). Stabile kolloidale systemer kan oppnås ved hjelp av frastøtende krefter (elektrostatisk eller sterisk). Stabiliteten til kolloider kan beskrives via DLVO (Derjaguin–Landau–Verwey–Overbeek) teorien. DLVO-teorien tar høyde for de tiltrekkende Van der Waalske kreftene og frastøtende elektrostatisk kreftene, hvor kreftene summeres sammen for å beskrive den totale potensielle energien. De elektrostatisk kreftene er knyttet til det elektriske dobbeltlaget til partiklene (Kontogeorgis & Kiil, 2016). I et væskemedium vil partikler som oftest ha en ladning. Denne ladningen tiltrekker ioner av motsatt ladning som fører til dannelsen av det elektriske dobbeltlaget (Kulkarni, 2015), hvor man har to områder: Sternlaget hvor ioner av motsatt ladning er adsorbent til overflaten, og det diffuse laget hvor ionenes konsentrasjon

avtar (figur 2.3) (Labille & Bottero, 2011). Når det elektriske dobbeltlaget mellom to partikler overlapper vil dobbeltlagene frastøte hverandre (Kontogeorgis & Kiil, 2016).



Figur 2.3 illustrasjon av steriskstabilisering (A) (inspirert av (Kontogeorgis & Kiil, 2016)) og elektrostatiskstabilisering (B) (inspirert av (Labille & Bottero, 2011))

Partiklenes overflate kan få en ladning gjennom mange ulike prosesser: absorpsjon av ioner, oppløsning av overflategrupper, kjemisorpsjon av ioner, reaksjoner med HO^- og H^+ , adsorpsjon av ioniske surfaktanter eller polyelektrolytter. Ladningens fortegn og styrke kan påvirkes av pH-en eller konsentrasjonen av ioner som gir partikkelen ladning. Overflatepotensialet kan estimeres ved bruk av elektrokinetiske eksperimenter hvor man måler zetapotensialet til partiklene. Zetapotensialet har en tilnærmet lik verdi til overflatepotensialet. Punktet hvor partikkeloverflaten ikke har en ladning kalles isoelektrisk punkt (IEP). Ved dette punktet er de elektrostatiske kreftene mellom partiklene svake, og punktet bør unngås for opprettholde stabiliteten til kolloider (Kontogeorgis & Kiil, 2016). For metalloksider påvirkes ladningen av pH-en. Ved en spesifikk pH har ikke partiklene noe ladning (ved IEP). Er pH-en over IEP blir overflaten mer negativt ladet (M-O^-), er den under blir den mer positivt ladet (M-OH_2^+) (Rhodes, 2008). IEP kan finnes ved en pH-titrering hvor zetapotensialet måles som en funksjon av pH-en (Kontogeorgis & Kiil, 2016). Dersom metalloksid NPer er i nærheten av IEP kan enkelte ladde molekyler benyttes for å gi NPene en ladning. Det adsorberte laget av molekyler

vil gi NPene en ny overflateladning som skaper frastøtende elektrostatiske krefter mellom NPene (Labille & Bottero, 2011).

Knyttet til de frastøtende kreftene er stabiliteten til kolloider avhengig av tykkelsen på det elektriske dobbelaget og overflatepotensialet til partiklene. I følge DLVO-teorien vil man ha et høyt overflatepotensiale og tykt elektriskdobbeltlag. Avhengig av mekanismen bak det som gir partikkelen ladning, kan overflatepotensialet endres ved regulering av pH, fellesioner, ladningsstyrende ioner, ioniske surfaktanter, polyelektrolytter og ladde små molekyler. (Kontogeorgis & Kiil, 2016). Tykkelsen til det elektriske dobbelaget er invers proporsjonal med den ioniske styrken i mediumet, ved høye ioniske konsentrasjoner vil de repulsive kreftene svekkes og NPer kan følgelig agglomerere (Labille & Bottero, 2011).

Ved tilfeller hvor elektrostatisk stabilisering ikke er tilstrekkelig, kan man benytte sterisk stabilisering med polymerer (figur 2.3). Ved bruk av denne stabiliseringsformen vil polymerlagene på partiklene skape sterisk repulsjon mellom partikler. Dersom polymerene har ladninger vil de elektrostatiske kreftene til partiklene også påvirkes. Det er ønskelig at polymerene har affinitet for mediumet, er adsorbent og dekker partiklene fullstendig, hvis dette ikke er tilfelle, vil man kunne få attraktive krefter mellom partiklene i stedet for (Kontogeorgis & Kiil, 2016).

Organiske molekyler og polymerer benyttes for å stabilisere NPer, hvor stabiliseringen skjer gjennom mekanismer knyttet til ladningen eller steriske effekter (Ju-Nam & Lead, 2008). Det er blitt påpekt at sitrater kan ha en stabiliserende effekt på enkelte NPer hvor sitrationene adsorberes til NPene og gir de en mer negativ ladning ved enkelte pH intervaller (Mudunkotuwa & Grassian, 2010; Raza, Amjad, Kaur, & Wen, 2016; Tombácz et al., 2013). Basert på disse studiene, er det blitt undersøkt om sitrater fra sitronsyre og natriumsitrat kan ha en stabiliserende effekt på enkelte NPer brukt i denne oppgaven. Det er også blitt undersøkt om eddiksyre kan ha en stabiliserende effekt på CeO₂ NPer. Dette ble gjort på bakgrunn av at CeO₂ NPene som ble kjøpt inn ble levert som en suspensjon i 2,5% eddiksyre. Polymeren polyvinylpyrrolidone (PVP) har også blitt rapportert til å ha en stabiliserende effekt på NPer (Xia, Jiang, Liu, & Zhai, 2014). Det er dermed også blitt utforsket om PVP kan ha en gunstig effekt på stabiliteten til enkelte NPer. I dette prosjektet er to ulike PVP-molekyler blitt benyttet: PVP-10 med en gjennomsnittlig molarmasse på 10 000 g/mol og PVP-40 med en gjennomsnittlig molar masse på 40 000 g/mol.

2.2.4 Forbruk, forekomst og utslipp

NPer kan skilles basert på om de har et naturlig eller antropogent opphav. Videre, kan de antropogene NP-ene skilles basert på om de er skapt bevisst eller ubevisst som biprodukter (Nowack & Bucheli, 2007). I naturen er det betydelige mengder naturlige NPer som kan dannes via mange forskjellige prosesser. Fotokjemiske reaksjoner, vulkanutbrudd, skogbranner og støvstormer er alle prosesser som er kilder til naturlige NPer (Buzea, Pacheco, & Robbie, 2007). Fra havet kan NPer komme fra sjøsprøyt (Forbes, 2015). NPer kan dannes utilsiktet gjennom mange hverdagslige prosesser. NPer kan blant annet dannes via forbrenningsreaksjoner, matlaging, sveising, raffinering, smelteprosesser, forbrenning i bil- og flymotorer, og generelt ved forbrenning av olje og kull (Remédios, Rosário, & Bastos, 2012).

Antropogene nanomaterialer kan fremstilles på to ulike måter: ovenfra og ned eller fra bunnen og opp. Ovenfra og ned kan et bulkmateriale bli brutt ned til mindre bestanddeler via fysiske, kjemiske eller mekaniske prosesser inntil man får NPer. Med den andre fremgangsmåten, fra bunnen og opp, starter man med atomer og molekyler som reagerer under fysiske og kjemiske betingelser og danner NPer (Hornyak et al., 2009). DTU-miljø, det danske økologiske råd og det danske forbrukerrådet har utviklet en database som inneholder et register av tilgjengelige produkter som inneholder nanomaterialer (Nanodatabase, 2013). Per dags dato, er det listet 5003 produkter som inneholder nanomaterialer. Eksempler på materialer som er i bruk, eller er under utvikling, og som inneholder NPer inkluderer: kosmetikkprodukter (solkrem, andre kremer og sminke), mattilsetninger, matinnpakning, polymermaterialer, overflatebehandling av tekstiler (hindre bakterievekst), belegg på ulike produkter (skjermer, linser og vindu), målrettede medikamenter, solceller, katalysatorer og ulike elektronikk (Bleeker et al., 2015). NPer fremstilt for et spesielt formål kan slippes ut i miljøet via det vi kaller punktkilder eller diffuse kilder (Brar et al., 2015). Punktkilder kan være produksjonsfasiliteter, søppelfyllinger eller avløpsanlegg (Nowack & Bucheli, 2007). Diffuse kilder inkluderer blant annet utslipp knyttet til bruken av produkter som inneholder NPer (f.eks. kosmetikk og mat) (Peters et al., 2018) Utslipp kan også forekomme ubevisst under produksjon eller transport av NPer (Nowack & Bucheli, 2007). I miljøet kan NPer bli forandret av abiotiske og biotiske faktorer, som igjen påvirker den endelige fordeling av NPer i miljøet (Lowry & Casmane, 2009) og toksisitet (Garner & Keller, 2014). Eksempler på transformasjoner NPer kan gjennomgå i miljøet er fotokjemiske reaksjoner, oksidering, redusering, adsorbering av forbindelser, oppløsning, agglomerering, sedimentering og biologiske modifikasjoner som følger av levende organismer (f.eks. biologisk degradering eller interaksjoner med biomolekyler) (Hartmann et al., 2014).

Forandringene som skjer med NPer i miljøet er avhengig av både egenskapene til NPene og betingelsene i miljøet (Lead et al., 2018).

2.2.5 Toksiske egenskaper

Både størrelse, kjemisk sammensetning, overflatestruktur, løselighet, form og agglomereringstilstand er viktig for de biologiske effektene til NPer. Disse faktorene påvirker blant annet NPenes evne til å bli tatt opp i celler, binde seg til proteiner og mulighet til å gjøre vevsskade (Jain, 2012). Opptak av NPer i menneskekroppen kan potensielt foregå via lunger, huden og fordøyelseskanalen (Baeza-Squiban, Vranic, & Boland, 2013). Injeksjoner og implantater kan også være mulige eksponeringsruter for mennesker i spesielle tilfeller. Etter opptak i kroppen kan NPene gå over i både blod og lymfesystemet og deretter til andre vev og organer (Kumar & Kumbhat, 2016). NPer kan tas opp i celler via endocytose eller ikke-endocytosiske måter, og kan interagere med ulike komponenter i cellen som følge av deres lille størrelse (Baeza-Squiban et al., 2013). Hillyer og Albrecht (2001) har vist at gjennom oraltilførsel kan Au NPer på 4-28 nm spre seg til både blod, hjerne, hjerte, lunger, nyrer, milt og lever, hvor de minste NPene spredte seg mest effektivt. Studier har også vist at både iridium (Kreyling et al., 2009; Yu et al., 2009) og kadmiumoksid NPer (Dumkova et al., 2016) kan tas opp via luftveiene og deretter overføres videre til andre organer i kroppen. Utskilling av NPer fra kroppen skjer via to ruter: urin etter filtrering i nyrene, eller i ekskrementer, etter å ha blitt skilt ut i galle fra leveren (Houdy, Lahmani, & Marano, 2011).

En foreslått sentral del av NPer sin toksisitet er dannelsen av reaktive oksygenforbindelser (ROS) (Yan, Zhou, & Gardea-Torresdey, 2017). NPer kan skape en økt mengde ROS i celler på ulike måter, både direkte og indirekte. Enkelte NPer kan indirekte øke ROS mengden i celler ved å indusere en inflammatorisk respons, hvor inflammatoriske celler produserer ROS. Andre NPer har iboende egenskaper som skaper ROS (Baeza-Squiban et al., 2013). NPer kan f.eks. bestå av innskuddsmetaller som kan fungere som katalysator for reaksjoner som danner ROS. Mange forbindelser som kan indusere oksidativ skade kan også adsorberes til NPer sin overflate (Kumar & Kumbhat, 2016). I cellen kan ROS reagere med ulike makromolekyler (f.eks. karbohydrater, proteiner, lipider, DNA og RNA) og kan endre makromolekylene kjemiske struktur og biologiske funksjon. En stor mengde frie radikaler kan derfor resultere i at cellevekst og -deling kommer ut av kontroll og det kan også lede til celledød (L'Azou & Marano, 2011). Dysfunksjon i de grunnleggende celleprosessene som NPer kan påvirke (cellevekst,

celledeling, metabolisme og celledød) kan knyttes til rekke sykdommer, som f.eks. kreft og nevrodegenerative sykdommer (Kumar & Kumbhat, 2016).

2.2.6 Nanopartikler i det marine miljø

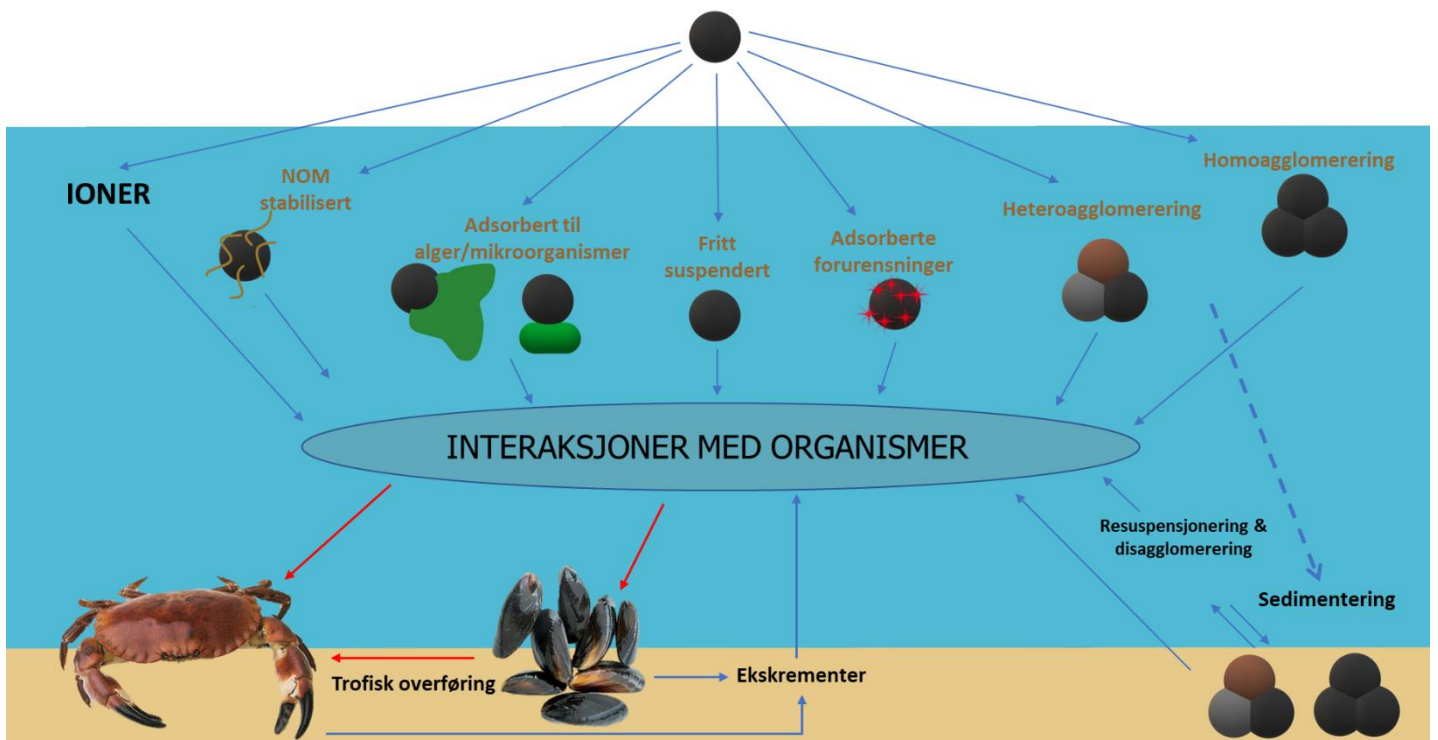
NPer kan komme inn i marine miljø via avsetning fra luften, avløpsvann, avfall eller elvesystemer (Baker et al., 2014). I det marine miljø kan NPer kunne interagere med marine organismer og potensielt indusere toksiske effekter (figur 2.4) (Rocha, Gomes, Sousa, Mestre, & Bebianno, 2015).

For å forstå skjebnen til NPer i det marine miljø er det viktig å ha innsikt i deres interaksjoner med ulike faktorer i det marine miljø som f.eks.: kolloider i miljøet, naturlig organisk materiale (NOM), pH og ionestyrke (Christian, Von der Kammer, Baalousha, & Hofmann, 2008). Mohd Omar, Abdul Aziz, og Stoll (2014) har vist hvordan ulike konsentrasjoner av NOM kan interagere med NPer ved forskjellige pH-verdier. I noen tilfeller ble mer agglomerering observert med NOM, i andre tilfeller fungerte NOM som en stabilisator via elektrostatiske og steriske mekanismer.

I saltvann vil en rekke NPer kunne agglomerere raskt som følge av den ioniske styrken i vannet, noe som svekker NPene sitt elektriske dobbeltlag (se kap. 2.2.3). Lavere konsentrasjon av NOM i saltvann gir også mindre stabilisering av NPene. Det er også indikasjoner på at NPene sedimenterer raskere i saltvann. Hurtig agglomerering kan begrense eksponeringen av NPer til pelagiske organismer, men bentiske organismer kan potensielt være mer utsatt som følge av den raske sedimenteringen (Garner & Keller, 2014). Ved å stabilisere overflaten til NPer kan potensielt levetiden i vannsøylen øke, det kan også gjøre at NPene spres ytterligere i marine miljø (Christian et al., 2008). Mange NPer kan også forbli i partikkelform over lengre perioder (fra uker til måneder) uten at de løses opp til ioner. Dette betyr at mange marine arter kan bli eksponert for NPer (Garner & Keller, 2014). Enkelte NPer som ZnO løser seg hurtig opp i saltvann (Miller et al., 2010), og deres toksiske effekter på organismer knyttes til ionene som blir frigitt når NPene løser seg opp (Franklin et al., 2007).

I marine miljø kan marine organismer interagere med ulike former for NPer: individuelle NPer, NP agglomerater, NPer stabilisert av NOM, ioner frigitt fra NPer, metallkomplekser, NPer adsorbent til biote som f.eks. alger eller NPer med adsorberte forurensninger (Rocha et al., 2015). En rekke organismer har vist seg å kunne ta opp NPer. Hos biofilmer som inneholder

bakterier ble NPer funnet adsorbent til celleoverflaten til bakteriene, og enkelte NPer virket også til å være internalisert i bakteriecellene (Fabrega, Renshaw, & Lead, 2009). Flerbørstemark har vist seg til å kunne ta opp NPer oralt (Wang, Yin, Zhao, & Xing, 2016). Det er også blitt påpekt at NPer potensielt kan dannes i organismer fra ioner tatt opp fra miljøet. Dette ble vist for muslingarten *Mytilus galloprovincialis*, hvor Ti NPer ble dannet i blåskjell etter opptak av ionisk Ti (Galocchio et al., 2020). Ettersom NPer kan bli tatt opp i enkelte marine organismer, er det en potensiell mulighet for NPer å bli overført fra lavere trofiske organismer til høyere, og at de hoper seg opp i næringskjeden (Peng, Zhang, et al., 2017). Wang et al. (2016) viste at piggvar kunne ta opp TiO_2 NPer gjennom trofiskoverføring fra en flerbørstemark til piggvar, men det ble ikke registrert noe biomagnifisering i dette tilfelle.



Figur 2.4 potensiell skjebne til NPer i det marine miljø inspirert av (Rocha et al., 2015) og (Laborda, Bolea, Cepriá, et al., 2016).

2.3 Blåskjell

2.3.1 Generelt om arten

Blåskjell (*Mytilus edulis*) er av dyregruppen bløtdyr og tilhører muslingene (Nysæther, 1984). Arten er utbredt langs hele norskekysten (Bøhle, 1972) og finnes på dyp fra 0 til 10 meter (Møller Christensen & Christiansen, 1978). Man finner blåskjell i tidevannssonen og under tidevannssonen, fra mer skjermede omgivelser til områder sterkt utsatt av bølger (Gosling, 2015), de tåler også betydelige variasjoner i saltkonsentrasjon og temperatur (Møller Christensen & Christiansen, 1978). Blåskjell inntar føde ved å filtrere vannmassene for næring (Bøhle, 1972). Hos filterspisende muslinger benyttes gjellene som respirasjonsorgan samtidig som at de har en rolle for å innta føde. Gjellenes flimmerhårtrakter fanger opp suspenderte partikler fra vannmassene som pumpes gjennom kappehulen. Føden består av ulike suspenderte partikler som bakterier, fytoplankton, microzooplankton, detritus og oppløste organiske materialer. Sortering av materiale før inntak kan lede til dannelsen av pseudoekskremitter som skjellene kan avvise. Dannelsen av pseudoekskremitter er bl.a. knyttet til kontroll over mengden føde skjellene inntar. Det kan også være knyttet til å fjerne uønskede materiale, hvor seleksjonen er basert på egenskapene til partiklene (Gosling, 2015).

Muslinger har to skall som henger sammen på ryggsiden og er bundet via et ligament. Skjellene har også muskler som holder skallene sammen. Avslapning i ligamentet og stramming av musklene kan benyttes til å åpne og lukke skjellet. Skallene som hovedsakelig består kalsiumkarbonat, har flere funksjoner. De fungerer blant annet som et skjelett for festing av muskler og gir beskyttelse mot predatorer (Gosling, 2015). Kappen til muslingene er som to blad mellom muslingenes to skall, og kappen danner kappehulen hvor de indre organene til organismen befinner seg (Møller Christensen & Christiansen, 1978). Foten til en rekke muslingarter (bl.a. blåskjell) skiller ut byssustråder som fester skjellene til ulike substrater og andre skjell (Gosling, 2015).

Blåskjell er særkjønnede og kan bli omtrent 15 år gammel (Møller Christensen & Christiansen, 1978). De benytter seg av en ytre befruktningsform og i livssyklusen deres har de også et pelagisk larvestadie (Bøhle, 1972). I larvestadiet vil muslinger etter hvert feste seg til et substrat for å så gjennomgå morfologiske endringer i overgangen fra et pelagisk liv til et bentisk, endringene som tar plass gjør dem mer tilpasset et stillestående liv (Gosling, 2015).

En rekke muslingarter er ideelle organismer for å overvåke miljøet. Mange av artene har en stor geografisk utbredelse, stabile populasjoner, de flytter lite på seg, er tolerante til miljømessige forandringer, er filterspisere, de metaboliserer fremmedstoffer lite effektivt og biokonsentrerer forurensninger. Slekten *Mytilus* som blåskjellene er en del av, blir benyttet som indikatorer for marin forurensning (Cubero-Leon & Ciocan, 2013). Muslinger kan akkumulere høye mengder av pesticider, metaller og hydrokarboner fra miljøet de lever i (Gosling, 2015).

2.3.2 Blåskjell & nanopartikler

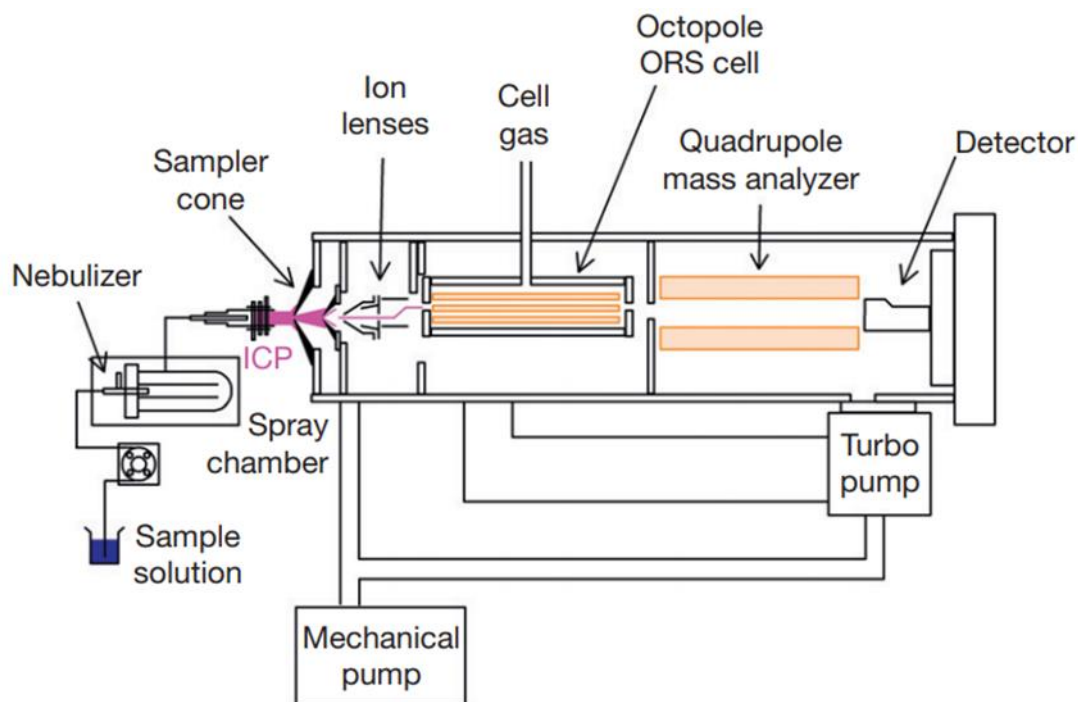
Som filterspisere kan muslinger potensielt akkumulere NPer fra vannmassene i mange ulike former: enkle NPer, homoagglomerater, heteroagglomerater, NPer adsorbent til alger, NOM stabiliserte NPer eller NPer med adsorbente forurensninger (figur 2.4) (Rocha et al., 2015). Det er tidligere vist at blåskjell kan innta NPer av TiO₂ (Doyle et al., 2016) og Au (Tedesco, Doyle, Blasco, Redmond, & Sheehan, 2010). NPer av Au og TiO₂ viste seg å hovedsakelig akkumulere i fordøyelseskjertelen hos blåskjell (Doyle et al., 2016; Tedesco et al., 2010). Ved eksponering av blåskjell til CuO NPer ble Cu funnet hovedsakelig i gjellene (63%) og fordøyelseskjertelen (28%), mens mindre mengder ble funnet i kappen (9%) (Hu et al., 2014). Doyle et al. (2016) viste også at mesteparten av TiO₂ NPer blir raskt fjernet fra organismen i form av ekskrementer og at NPene ikke akkumulerte seg i vevet ved akutt eksponering (2 timer). Men som det blir påpekt i studiet burde mer langvarige eksponeringsforsøk bli gjort for å vurdere bioakkumulering av TiO₂ NPer. I Joubert et al. (2013) sin 16 dagers eksponering av Au NPer til muslingen *Scrobicularia plana*, viste NPene evne til å internalisere seg i celler i fordøyelseskjertelen og gjellene. I cellene til fordøyelseskjertelen ble Au NPer også funnet i cellekjernen. Det er blitt vist at muslingen *Mytilus galloprovincialis* kan innta CeO₂ NPer via fyttoplankton som har NPer adsorbent til seg (Conway et al., 2014). NPer som blir tatt opp i celler i muslinger kan friggi ioner, skape økt oksidativt stress, påføre celledskade i proteiner, membraner og DNA (Rocha et al., 2015).

Filterspisende muslinger kan fange større partikler enn 6 μm med en effektivitet på 90%, men effektiviteten minker med partikklenstørrelsen og partikler på $<1 \mu\text{m}$ blir fanget med en effektivitet på $<15\%$ (Canesi et al., 2012). Dette passer sammen med funnet til Ward og Kach (2009) hvor det ble rapportert at filterspisende muslinger tok opp agglomerater mer effektivt enn frie NPer. Men enkelte mener fortsatt at inntaket av fritt suspenderte NPer er undervurdert (Hull, Vikesland, & Schultz, 2013). I studiene diskutert tidligere, hvor blåskjell ble eksponert for Au NPer (Tedesco et al., 2010) og CuO NPer (Hu et al., 2014) ble ikke NPene karakterisert i sjøvann, det er dermed usikkert om NPene ble inntatt som agglomerater eller som frie NPer. I eksponeringen av blåskjell til TiO_2 NPer ble det mistenkt at NPene ble inntatt som agglomerater (Doyle, Ward, & Mason, 2015). Joubert et al. (2013) foreslo også at Au NPene ble tatt opp i form av agglomerater, men det ble observert frie NPer i vev og ekskrementer hos skjellene. Det ble også foreslått at de frie NPene kom fra agglomerater som ble brutt opp av skjellet ved fordøyelseskjertelen eller via flimmerhår i gjellene (Joubert et al., 2013). Som påpekt i kap. 2.2.6 er det indikasjoner på at enkelte NPer vil kunne agglomerere i sjøvann som følge av den høye ioniske styrken i vannet. Som presentert her og av Gallochio et al. (2020) vil denne agglomereringen potensielt gjøre NPer mer tilgjengelig for filterspisere.

2.4 Analyseteknikker

2.4.1 Induktivt koblet plasma massespektrometri

Induktivt koblet plasma massespektrometri (ICP-MS) er en attraktiv analyseteknikk for spormetaller. Teknikken har lave deteksjonsgrenser i nedre delen av ng/L skalaen men også kvantifiseringsmuligheter i øvre mg/L område, ICP-MS har således mulighet for et stort dynamisk måleområde (Thomas, 2013). Sensitiviteten til instrumentet, det store lineære område, mulighet til å analysere flere analytter samtidig, samt mulighet for å skille mellom isotoper og grunnstoff, er egenskaper som har bidratt til å gjøre denne teknikken til en favoritt for å bestemme elementer i en et bredt spekter av matrikser (Cubadda, 2007). Den generelle oppbygningen til instrumentet er illustrert i figur 2.5.



Figur 2.5 illustrasjon av ICP-MS oppsett (Olesik, 2014)

Prøver i ulike former (gass, fast og væske) kan analyseres med ICP-MS instrumentet (Cullen, 2004). I dette prosjektet blir prøvene analysert i et væskemedium hvor en peristaltisk pumpe sørger for en jevn strøm av prøven til en forstøver. I forstøveren dannes aerosoler ved hjelp av argongass, aerosolene beveger seg videre gjennom et spraykammer som fjerner de største aerosol dråpene, før aerosolene beveger seg videre inn i plasmafakkelen (Agilent Technologies, 2017a). En spole på enden av fakkelen produserer et elektromagnetisk felt via radiofrekvenser som går gjennom spolen. Dette elektromagnetiskfeltet akselererer elektroner som fås ved å

utsette argongassen i kvartsfakkelen for en høyspent gnist. Ioniseringen av gassen fortsetter ved at de akselererte elektronene kolliderer med argonatomer og river flere elektroner fri, denne kjedereaksjonen fortsetter og man får et plasma bestående av elektroner, argonioner og argonatomer (Thomas, 2013). Temperaturen til plasmaet kan variere mellom 5000 – 10 000 K (Olesik, 2014). I plasmaet blir aerosolene fra prøver tørket, fordampet, atomisert og ionisert til positive ioner. Ionene blir videre overført til grenseflateområde, rollen til dette område er å transportere ionene fra plasmaen som opererer i atmosfæretrykk (760 torr) til massespektrometeret som operer i vakuum (ca. 10^{-6} torr). Grenseflateområde blir holdt under et vakuum på 1-2 torr via en mekanisk pumpe, området inneholder også to til tre kjegler med åpninger i, avhengig av instrumentets design (Thomas, 2013). Agilent 7900 instrumentet benyttet i denne oppgaven har to kjegler (Agilent Technologies, 2017a). Ionene fra plasmaet blir ført gjennom kjeglene, for å så blir ført videre av ionelinsene til massespektret. Ionelinsene som blir holdt under et vakuum på ca. 10^{-3} torr forhindrer ikke-ioniske bestanddeler i å nå massespektrometeret, som ellers ville ha gitt mer støy og mer ustabil signal (Thomas, 2013). De ikke-ioniske bestanddelene (nøytrale arter og fotoner) kan forhindres ved bruk av konfigurasjoner som bøyer ionestrømmen (Taylor, 2001).

Mange instrumenter har en kollisjon/reaksjoncelle plassert mellom ioneoptikkene og massespektrometeret (Olesik, 2014). Instrumentet benyttet i denne oppgaven inneholder en celle med en oktopol (Agilent Technologies, 2017a). Cellen kan benyttes for å redusere dannelsen av mange polyatomiske interferenser som kan påvirke deteksjonen av en rekke analytter. Interferensene kommer i form av ioner som genereres av argongassen, løsemiddelet og matriksen. Et eksempel på en polyatomisk interferens er $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}^+$ i bestemmelsen av $^{56}\text{Fe}^+$ (Thomas, 2013). Cellen kan utsettes for kollisjon-/reaksjongass, men uten noe gass leder cellen bare ionene videre til massespektrometret. I cellen kan effekten interferensene har på signalet til den bestemte analytten forebygges via to ulike prinsipper: kinetisk energi diskriminering (KED) og ione-molekylreaksjoner. Ved bruk av KED vil molekyler med en større overflate enn analyttionene få en lavere kinetisk energi i ferden gjennom cellen med kollisjongass, dette kommer av at større molekyler statistisk sett vil oppleve flere kollisjoner med gassen. Videre kan en spenningsbarriere mellom kollisjon-/reaksjoncellen og massefilteret hindre ionene med lavere kinetisk energi i å nå massefilteret. Ione-molekylreaksjoner kan fjerne spektrale overlapp ved ladningsoverføringsreaksjoner eller atom addisjonsreaksjoner. Atom addisjonsreaksjoner kan f.eks. benyttes på analytten av interesse for å lage et nytt molekyl som inneholder analytten, dette gjør at man kan måle analytten ved en høyere masse som evt. ikke har noe spektral

overlapp. Ladningsoverføringsreaksjoner kan benyttes på interferenser som har høyere ioniseringsenergi enn den nøytrale reaksjonsgassen. Eksempelvis kan interferensen ArO^+ reagere med NH_3 i en reaksjon som overfører ladningen til NH_3 , ettersom NH_3 har en lavere ioniseringsenergi enn ArO^+ , mens analytten jern ikke vil inngå i en slik reaksjon med NH_3 ettersom jern har en lavere ioniseringsenergi enn NH_3 (Olesik, 2014).

I denne oppgaven blir en kvadrupol benyttet som massefilter. Hos massefilterets fire stenger blir vekselstrøm og likestrøm påført på hvert sitt par av stengene. Ved å bestemme vekselstrøm- og likestrømpotensialet over stengene vil de ønskede analytt-ionene bli ledet til detektoren i instrumentet, mens ionene med en annen masse til ladning ratio (m/z) vil opptre ustabil og vil falle ut av kvadrupolen. (Thomas, 2013). ICP-MS-instrumentet benyttet i denne oppgaven har en detektor i form av en elektronmultiplikator. I elektronmultiplikatoren treffer analytt-ionene en dynode som frigjør elektroner, disse elektronene frigjør igjen et større antall elektroner for hver nye dynode de treffer, elektronene blir videre detektert som et elektrisk signal. Elektronmultiplikatoren kan operere i puls- eller analogmodus. Ved lavere konsentrasjoner av ioner benyttes pulsmodus, hvor signalene detekteres som pulser. Analogmodus benyttes ved høyere konsentrasjoner av ioner, hvor ione-signalene detekteres som elektrisk strøm, i stedet for individuelle elektriske-pulser (Agilent Technologies, 2017a)

I instrumentet kan spektrale interferenser påvirke målinger av spesifikke ioner. Det er fire hovedtyper av spektrale interferenser: isobarisk overlapp, polyatomisk overlapp (beskrevet tidligere), flerladete arter (ofte dobbelladet) og bakgrunnsbidrag. Bakgrunnsbidraget er signaler som måles uten at det nødvendigvis er noe analytt tilstede. Dette kan komme av tilfeldige ioner, fotoner og elektrisk støy fra detektoren. Dobbeltladete interferenser kan dannes av enkelte elementer med lavt ioniseringspotensial. Dersom det er analytten av interesse som får en dobbeltladning, vil dette gi en dårligere sensitivitet av analytten, ettersom isotopen man vil måle går tapt. Dobbeltladete ioner kan også være en interferens som gir et bidrag til andre analytter hvis elementene har lik m/z verdi (Taylor, 2001). Mengden dobbeltladete ioner kan reguleres ved endring av ioniseringsforholdene i plasmaet. Isobariske interferenser kommer av at andre elementer i prøven deler isotoper med lik m/z verdi til isotopen av analytten av interesse. Denne formen for interferenser kan korrigeres med ulike matematiske formler. Matriksen kan også være en kilde til interferenser. Matriksen kan undertrykke analytt-signaler ved å påvirke forstøvningen av prøven eller dråpe seleksjonen i spraykammeret. Matriksen kan også undertrykke analytt-signalet ved å forandre ioniseringsforholdene i plasmaet. Tyngre elementer

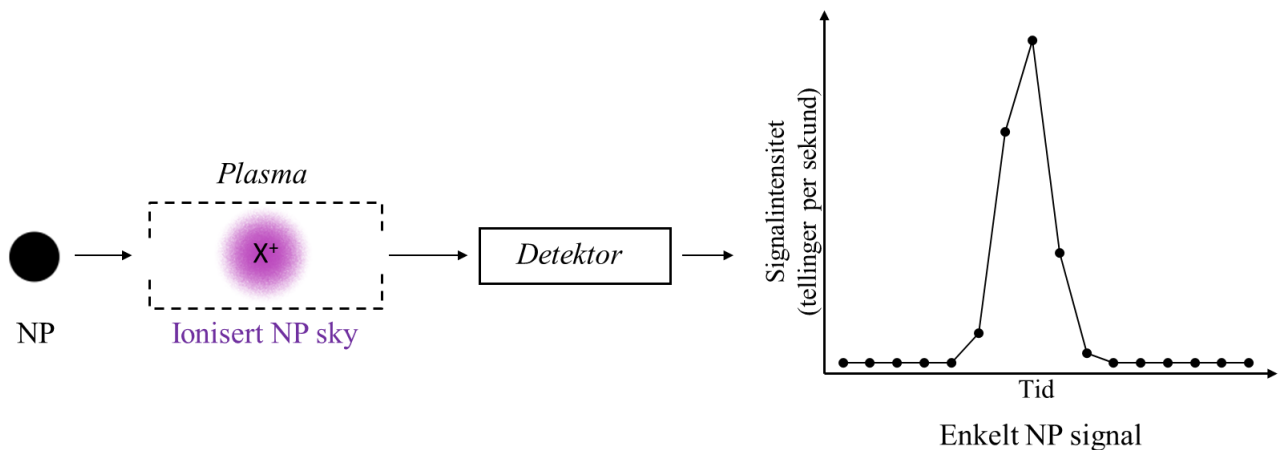
fra matriksen kan potensielt også dytte lettere elementer ut av ionestrømmen i ionelinsene. Dette kan føre til dårligere sensitivitet og deteksjonsgrenser. En indre standard benyttes ofte for å korrigere for variasjoner i analytt-signalet som følger av matriksen (Thomas, 2013).

2.4.2 Enkeltpartikkel induktivt koblet plasma massespektrometri (sp-ICP-MS)

For sp-ICP-MS analyse kan de fleste nye kommersielle ICP-MS instrumenter benyttes, uten at instrumentene må modifiseres. Det eneste som kan være nyttig er en programvare for databehandlingen av resultatene (Meermann & Nischwitz, 2018). sp-ICP-MS skiller seg fra vanlig ICP-MS ved at kortere måleintervaller blir benyttet (≤ 10 ms), hvor hver individuelle måling plottes mot tid (Pace et al., 2011). sp-ICP-MS gir kvalitativ informasjon om det er partikler og/eller oppløste former av et element tilstede. Samtidig gir den kvantitativ informasjon om antallet partikler, og massekonsentrasjonen til partiklene og/eller de oppløste elementene. Den målte massen per partikkel kan også benyttes til å beregne størrelsen til partiklene (Laborda, Bolea, & Jimenez-Lamana, 2016).

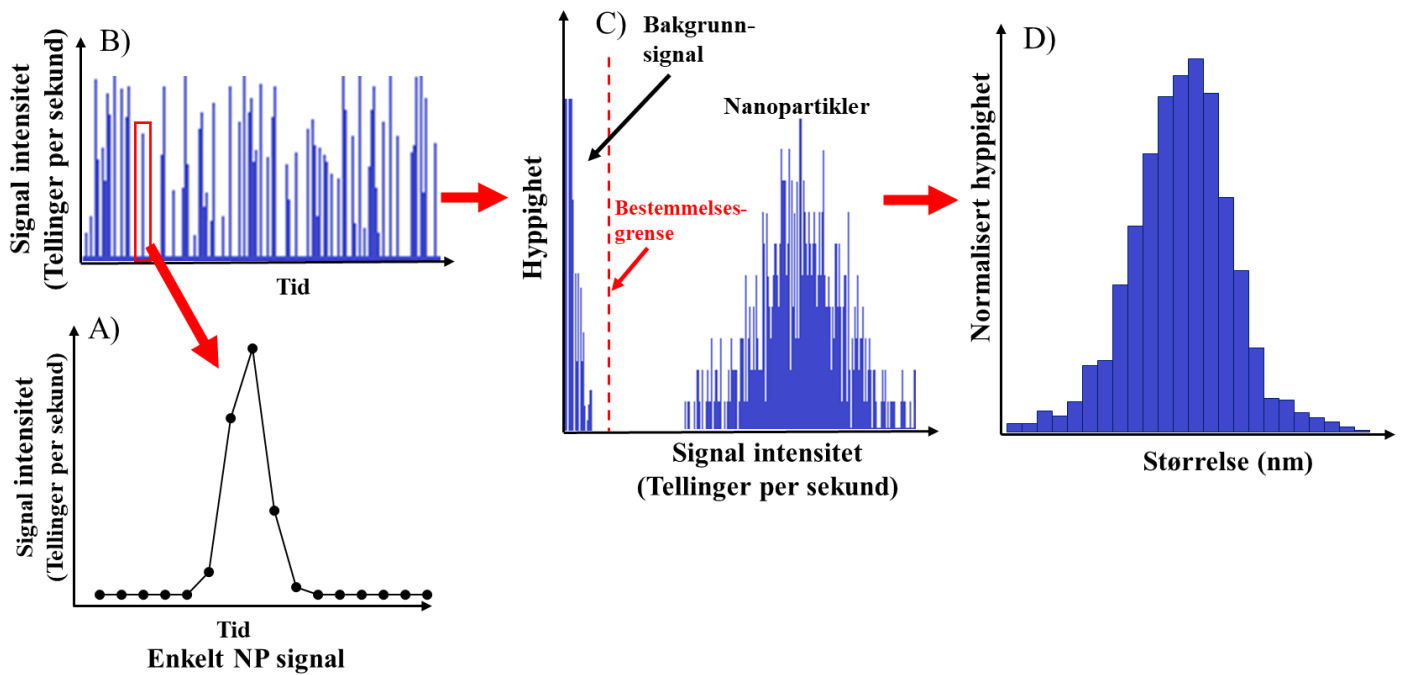
En analyse av oppløste metaller hvor ionene er homogent distribuert i en løsning, vil skille seg fra en analyse av en prøve som inneholder NPer i suspensjon. Ved analyse av en løsning med homogent distribuerte ioner, vil man kunne få et relativt stødig signal over tid, ettersom en tilnærmet konstant strøm av ioner vil nå detektoren i instrumentet. I en suspensjon av NPer er det ikke den samme homogene distribusjonen av grunnstoffet, ettersom at grunnstoffet finnes som «klynger» i de diskrete partiklene. I analysen av NP-suspensjoner vil NPene bli atomisert og ionisert i plasmaet, og «pakker» med ioner som tilhørte NPene vil bli detektert, istedenfor en jevn strøm av ioner, som man får i analysen av oppløste analytter. Pakkene med ioner fra NPene gir et NP-signal i form av en «puls» over et bakgrunnsignal (Pace et al., 2011). Ved bruk av måleintervaller i millisekundskalaen får man ett målepunkt per enkelt NP-signal, men hvis man benytter seg av måleintervaller i mikrosekundskalaen (f.eks. 100 μ s) kan flere målepunkter fås per enkelte NP (figur 2.6) (Sannac, 2015), da et NP-signal er typisk ca. 200-500 μ s langt (Montaño, Olesik, Barber, Challis, & Ranville, 2016). Når man har flere målepunkter per NP-signal, kan målepunktene summeres sammen slik at signalet representerer en enkelt NP (Abad-Alvaro et al., 2016). Bakgrunnsignalet som man får kommer av oppløste former av analytten

som måles og instrumentstøy (Montaño et al., 2016). En av antakelsene til sp-ICP-MS, er at hvert detekterte NP-signal tilhører én enkelt NP. Dersom antakelsen er sann, vil antallet NP-signaler være relatert til partikkelantallet i suspensjonen. Intensiteten til et NP-signal er proporsjonal med massen til partikkelen. Massen til en NP kan videre regnes om til størrelsen hvis grunnstoffsammensetningen, tettheten og formen til NPene er kjent eller antatt (Laborda, Bolea, & Jimenez-Lamana, 2016). Programvaren i denne oppgaven antar at NPene er sfæriske (Agilent Technologies, 2017b).



Figur 2.6 skjematisk illustrasjon av sp-ICP-MS analyse av NPer.

Fra sp-ICP-MS-instrumentet får man et tidsoppløst råsignalplott med NP-signaler over en bakgrunn målt over en viss tid (figur 2.7 B). Råsignalplottene kan prosesseres ved å plote NP-signal intensitetene mot antallet av målinger ved de bestemte intensitetene. Dette gir et signalintensitetshistogram hvor man får to distribusjoner (figur 2.7 C), den første distribusjonen tilhører oppløste former av analytten eller bakgrunnsstøy, mens den andre distribusjonen tilhører NPer. Signalintensitetshistogrammene kan videre prosesseres til størrelsesfordelingen for NPene (figur 2.7 D) (Laborda, Bolea, & Jimenez-Lamana, 2016). I prosesseringen av data fra NPer, må en størrelsebestemmelsesgrense settes i signalintensitetshistogrammet (figur 2.7 C) for å skille NP-målinger fra bakgrunns signaler. Grensen kan settes med utgangspunkt i ulike regnemetoder, programvarens automatiske valg, eller så kan man benytte en tilnærming som Peters et al. (2015), hvor man setter en grense ved å visuelt betrakte signalintensitetshistogrammet.



Figur 2.7 illustrasjon av ulike plott fått med sp-ICP-MS ved analyse av NP suspensjoner: enkelt NP signal (A), råsignalplott (B) som prosesseres til et signalintensitetshistogram (C) som prosesseres til størrelsesfordelingen til NPene (D).

Når en NP blir målt får man et signal, men for at dette signalet skal omregnes til en partikkelmasse, og deretter en størrelse, trenger man en kalibrering. NP-standarder med lik grunnstoffsammensetning, form og tetthet kan benyttes for en direkte kalibrering, men ettersom det er få veldefinerte NP-standarder tilgjengelig er det utfordrende å implementere denne metoden (Meermann & Nischwitz, 2018). Alternativt, kan man benytte metoden utviklet av Pace et al. (2011) hvor man bruker ioniske standarder av NP-analytten som analyseres og et begrep betegnet som transporteffektiviteten (TE). TE betegnes som forholdet mellom mengden analytt som blir forstøvet og mengden som når plasmaet (Jimenez-Lamana, Wojcieszek, Jakubiak, Asztemborska, & Szpunar, 2016). Signalet til én enkelt NP er ikke avhengig av volumet væske som følger med NPen ettersom hele NPen blir ionisert i plasmaen. Signalet til ioniske standarder er derimot avhengig av konsentrasjonen av standarden og volumet av standarden som når plasmaet. Siden signalet til den ioniske standarden er avhengig av volumet væske som når plasmaet, men ikke signalet til én enkelt NP, må TE tas høyde for når man skal kalibrere instrumentbestemmelsen på denne måten (Pace et al., 2011).

TE kan bestemmes manuelt: ved å måle forholdet mellom væske som går ut av spraykammeret som avfall, og mengden væske som blir pumpet inn i spraykammeret. Alternativt kan man benytte et NP-referansemateriale hvor TE måles gjennom partikkelantall- eller partikkelstørrelsesmetoden. I partikkelantallmetoden benyttes forholdet mellom antallet partikler målt, og det kjente teoretiske antallet partikler i NP-standarden (Pace et al., 2011). I partikkelstørrelsesmetoden benyttes sensitivitetsforholdet mellom en NP-standard og en ionisk standard. Signalet fra en enkelt NP er som nevnt ikke avhengig av TE, i motsetning til signalet fra en ionisk standard. Forholdet mellom signalet per ng analytt fra den ioniske standarden og signalet per ng analytt fra NP-standarden gir følgende TE (formel 1.1) (Montaño et al., 2016). I tillegg til kalibrering, benyttes TE for å beregne det opprinnelige partikkelantallet i prøvesuspensjoner (Pace et al., 2011).

$$\text{Transporteffektivitet} = \frac{\left(\frac{\text{Signal fra ioniskstandard}}{\text{Massen til ioniskstandard levert til forstøver}} \right)}{\left(\frac{\text{Signal fra NP}}{\text{Massen til NP}} \right)} \quad (\text{formel 1.1})$$

Dersom Pace et al. (2011) sin metode skal benyttes, trenger man altså en ionisk standard av samme analytt som NPene som skal analyseres, og en metode for å bestemme TE. I denne oppgaven er partikkelstørrelsesmetoden benyttet for å bestemme TE, og det er blitt brukt 60 nm Au NPer som NP-standard, sammen med en ionisk Au standard.

En øvre størrelsesgrense på 1-5 µm for partikler er anbefalt på bakgrunn av ufullstendig fordampning av større partikler i plasmaet, og på grunn av at store partikler kan bli fjernet i spraykammeret (Laborda, Bolea, & Jiménez-Lamana, 2014). Den nedre størrelsesgrensen styres av om NPene klarer å produsere en puls som kan skilles fra den kontinuerlige bakgrunnen (Laborda, Jimnez-lamana, Bolea, & Castillo, 2013). Med databehandlingen i denne oppgaven blir den minste målbare NP-størrelsen lik til størrelsebestemmelsesgrensen satt i signalintensitetshistogrammet (figur 2.7 C). Knyttet til den øvre grensen til partikkelantallet ønsker man å ha en tilstrekkelig fortynnet suspensjon, slik at flere partikler ikke blir målt i et og samme måleintervall (Pace et al., 2012). Den nedre grensen for partikkelantallet kan knyttes til antallet NP-signaler i en blank prøve, hvor grensen kan bli gitt gjennom standardavviket til NP-signalerne i en blank (antall partikler i en blank + 3 x standardavviket) (Peters et al., 2015).

2.4.3 sp-ICP-MS formler

Formlene som blir brukt av MassHunter-programvaren for å beregne sp-ICP-MS resultatene er vist nedenfor (formel 1.2-1.11) (Agilent Technologies, 2017b).

Respons faktor, s (cps/ppb), (formel 1.2)

$$S = \frac{I_{\text{ion}} - I_{\text{blk}}}{C_{\text{ion}}}$$

I_{ion} : Gjennomsnittet av signaler fra ionisk standard (CPS)

I_{blk} : Gjennomsnittet av signaler fra ionisk blank (CPS)

C_{ion} : Konsentrasjonen av ionisk standard (ppb)

Standard partikkelmasse, M_{std} (fg), til referansemateriale: (formel 1.3)

$$m_{\text{std}} = \frac{4}{3} \pi \cdot \left(\frac{d_{\text{std}}}{2 \times 10^7} \right)^3 \cdot \rho_{\text{std}} \cdot 10^{15}$$

ρ_{std} : Tetthet til referansematerialet (g/cm^3)

d_{std} : Referansematerialet sin diameter (nm)

Transporteffektivitet, η_n , partikkelantallmetode (formel 1.4)

$$\eta_n = \frac{N_p}{\frac{C_{\text{std}} \times 10^3}{m_{\text{std}}} \cdot V \cdot T}$$

N_p : Antall detekterte NPer

V : Opptak av prøve (mL/min)

T : Total analysetid (min)

C_{std} : Konsentrasjonen til referansematerialet (ng/L)

m_{std} : Standard partikkelmasse (fg)

Transporteffektivitet, η_n , partikkelstørrelsemetode (formel 1.5)

$$\eta_n = \frac{\frac{4}{3} \pi \cdot \left(\frac{d_{\text{std}}}{2} \right)^3 \cdot \rho_{\text{std}} \cdot S \cdot 60}{I_p \cdot t_d \cdot V \cdot f_d \cdot 10^{12}}$$

I_p : Topp intensiteten til referansematerialet (CPS)

f_d : Forholdet mellom molarmassen til NPer og molarmassen til analytten (f.eks. molarmasse CeO_2 / molar masse Ce)

S : Responsfaktor (cps/ppb)

t_d : Måleintervall (sek)

Transporteffektivitet, η_n , manuell metode (formel 1.6)

$$\eta_n = \frac{\text{opptak av prøve} \left(\frac{\text{ml}}{\text{min}} \right) - \text{mengden prøve tapt som avfall} \left(\frac{\text{ml}}{\text{min}} \right)}{\text{opptak av prøve} \left(\frac{\text{ml}}{\text{min}} \right)}$$

Massen til én enkelt NP i referansematerialeprøven, M_{p_n} (fg) (formel 1.7)

$$m_{p_n} = \frac{I_{rm_n}}{I_{rm}} \cdot m_{std}$$

I_{rm} : enkelt partikkelsignal til referansematerialet (cps)

I_{rm} : Gjennomsnittspartikkelsignal til referansematerialet (cps)

Partikkelantallkonsentrasjon til NP-prøve og referansematerialeprøve, C_p (partikler/L) (formel 1.8)

$$C_p = N_p \cdot \frac{1}{\eta_n} \cdot \frac{1}{V} \cdot \frac{1}{T} \cdot 10^3$$

η_n : Transporteffektiviteten

Massen til én enkelt NP, M_{p_n} (fg) (formel 1.9)

$$m_{p_n} = I_{p_n} \cdot \frac{1}{s} \cdot t_d \cdot V \cdot \eta_n \cdot 10^3 \cdot f_d \cdot \frac{1}{60}$$

I_{p_n} : Enkelt partikkelsignal (CPS)

Massekonsentrasjonen til NPene i en NP-prøve og referansematerialeprøve, C_m (ng/L) (formel 1.10)

$$C_m = \frac{\sum m_p}{10^3} \cdot \frac{1}{\eta_n} \cdot \frac{1}{V} \cdot \frac{1}{T}$$

m_p : Massen til én enkelt NP (fg)

Størrelsen til én enkelt NP i en NP-prøve og referansematerialeprøve, d_{p_n} (nm) (formel 1.11)

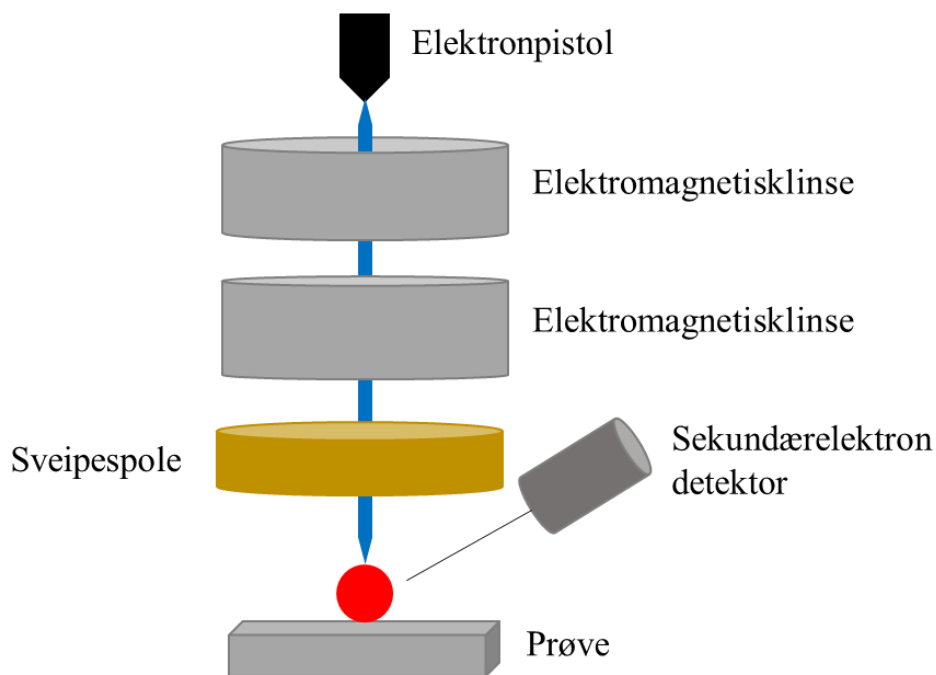
$$d_{p_n} = \sqrt[3]{\frac{6}{\pi} \cdot \frac{m_{p_n}}{10^{15} \cdot \rho_p}} \cdot 10^7$$

ρ_p : Tetthet analytt (g/cm³)

2.4.4 Sveipelektronmikroskop (SEM)

Elektronmikroskopi benytter en stråle av elektroner for å visualisere en prøve. Ettersom elektroner har en mindre bølgelengde enn synlig lys, kan elektronmikroskoper oppnå høyere oppløsninger enn ordinære optiske mikroskoper (Johal & Johnson, 2018). Sveipelektronmikroskopet (SEM) består av: en elektronpistol som produserer elektroner, et høyt elektrisk potensiale som akselerer elektronene, elektromagnetiske linser som fokuserer elektronstrålen på prøven, sveipespoler som manøvrerer sveipingene av prøven, et prøvekompartiment og en detektor som måler de ulike signalene fra interaksjonene av elektroner med prøven. Alle delene er under vakuum for å forhindre at elektronstrålen interagerer med molekyler i luften, uten vakuum ville man ha fått dårligere kvalitet på bildene (Chin et al., 2010). Ulike 2^o effekter som emitteres fra prøven og som kan detekteres er: sekundærelektroner, tilbakespredte elektroner og røntgenstråler (Hornyak et al., 2009). Sekundærelektroner oppstår når elektroner fra elektronstrålen kolliderer med elektroner i prøven og slår dem ut av deres bane. Deteksjon av sekundærelektroner gir god topografisk informasjon om prøven og er den mest vanlige formen for SEM bildetaking (figur 2.8). Tilbakespredte elektroner oppstår når elektroner fra elektronstrålen kolliderer med atomkjerner og blir reflektert tilbake. Deteksjon av disse elektronene gir informasjon om tettheten av atomer, ettersom områder med flere atomer gir flere tilbakespredte elektroner. Områdene som gir mer tilbakespredte elektroner framstår lysere på SEM-bilder. Røntgenstråler kan også oppstå når elektroner kolliderer med prøven. Når elektroner kolliderer med prøven, kan elektroner bli fjernet fra en lavere orbital, noe som fører til at elektroner fra et høyere orbital hopper ned for å fylle den tomme plassen. Transisjonen fra høyt til lavt orbitalnivå kan emitte røntgenstrålefotoner. Røntgenstrålene kan videre detekteres og benyttes til å identifisere elementene i prøven, ettersom elementer emitterer unike røntgenstråler (Chin et al., 2010).

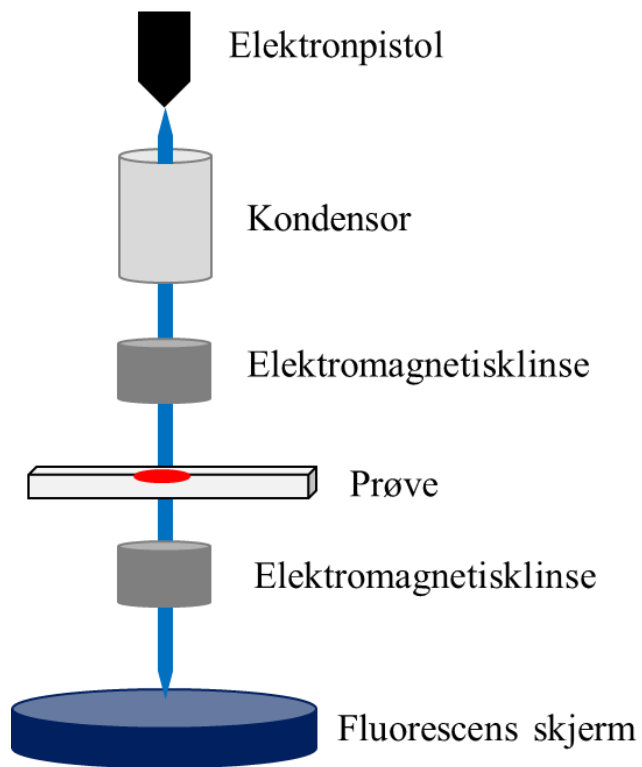
Isolerende prøver kan bli ladet ved analyse med SEM og dette fører til dårlig bildekvalitet. For å unngå dette tildekker man prøvene med en film som gjør prøven elektrisk ledende (Kulkarni, 2015). I denne oppgaven ble prøvene tildekt med karbon.



Figur 2.8 skematisk illustrasjon av hovedkomponenter i SEM inspirert av (Chin et al., 2010)

2.4.5 Transmisjonelektronmikroskop (TEM)

Transmisjonelektronmikroskopet (TEM) fungerer etter lignende prinsipper som SEM, men hos TEM transmitteres elektroner gjennom prøven og disse elektronene detekteres av en fosforplate (Hornyak et al., 2009). Ved TEM-analyse benyttes også ofte en høyere spenning for å akselerere elektronene. Ved denne høye akselerasjonen klarer elektronene å transmittere gjennom prøven (Chin et al., 2010). Når prøver analyseres med TEM, produserer først en elektronpistol elektroner, disse elektronene blir videre konsentrert og fokusert av elektromagnetiske linser. Videre treffer elektronstrålen prøven, og andelen elektroner som transmitteres gjennom prøven samles av en annen linse for å så bli rettet mot en fluorescens skjerm for å produsere et bilde av prøven (figur 2.9). Prøven bør være mindre enn 100 nm i tykkelse for å være gjennomtrengelig for elektronstrålen, men den egnede tykkelsen for prøver varierer med prøvetypen og energien til elektronene, høyere akselererte elektroner kan passere gjennom tykkere prøver. For å unngå interaksjoner med gasmolekyler opereres TEM også under vakuum (Johal & Johnson, 2018). Med TEM kan de fleste prøve-typer analyseres uavhengig om de er elektrisk ledende, halvledere eller isolerende. Instrumentet kan også gi svært høy grad av oppløsning, slik at man kan ta bilder på atom-nivå (Hornyak et al., 2009).



Figur 2.9 Skjematisk illustrasjon av TEM inspirert av (Johal & Johnson, 2018)

3. Eksperimentelt og metode

3.1 Kjemikalier og utstyr

I tabell 3.1 er det vist hvilke instrumenter og utstyr som er blitt benyttet i oppgaven. Tabell 3.2 viser en oversikt over kjemikaliene brukt, mens tabell 3.3 viser de benyttede instrumentinnstillingene til ICP-MS instrumentet.

Tabell 3.1 oversikt over instrumenter og utstyr benyttet.

Instrumenter og utstyr
Homogenisator POLYTRON System PT 2100
Wirlmixer, IKA MS1 minishaker
SEM Zeiss Supra 55 VP
TEM JEOL JEM-2100
Agar Turbo Carbon Coater (for SEM analyse)
Kobberist, FCF200-Cu Formvar-copper, Electron Microscopy Sciences (for TEM analyse)
Kjøkkenblender PHillips HR1371
Analysevekt New classic MF MS205DU Mettler Toledo
Analysevekt EXPLORER EX225D/AD OHAUS
Heidolph ristebord med inkubator
Millipore Milli-Q [®] vannrenseanlegg 18.2 MΩ.cm
Sentrifugerør 13 mL (polypropen)
Sentrifugerør 15 mL (polypropen)
Sentrifugerør 50 mL (polypropen)
Prøvebegre polypropen 120 mL (for oppbevaring av homogeniserte blåskjell)
Målekolber
1 L målesylinder
Glassflasker
Finnpipetter
Pasteurpipetter
Ultralydvannbad Branson 8800
Plastveieskip
Autosampler SPS4 (for sp-ICP-MS)
Agilent 7900 ICP-MS

Tabell 3.2 Benyttede kjemikalier samt deres leverandører og produktnummer

Kjemikalie	Leverandør	Produktnummer
Au NPer 60 nm 50 mg/L sitrat stabilisert	NanoComposix	AUCN60
Au NPer 60 nm 50 mg/L	PerkinElmer	N8142303
CuO NP-pulver <50 nm (TEM)	Sigma-Aldrich	544868-5G
ZnO NP-suspensjon i H ₂ O 20% (vekt %) <100 nm (TEM), gjennomsnitt ≤40 nm (APS)	Sigma-Aldrich	721077
ZrO ₂ NP-suspensjon 5% (vekt %) i H ₂ O <100 nm (BET)	Sigma-Aldrich	643122
CeO ₂ nanopulver <50 nm (BET)	Sigma-Aldrich	700290
CeO ₂ NP-suspensjon 30-50 nm 20% (vekt %) i 2,5% eddiksyre	Sigma-Aldrich	289744
Natriumsitrat ≥99,5%	Sigma-Aldrich	71402
Sitronsyre 99,5-100,5%	Sigma-Aldrich	27109
Konsentrert eddiksyre ≥99%	- ¹	-
Polyvinylpyrrolidon (PVP-40) gjennomsnitts molarmasse 40 000 g/mol	Sigma-Aldrich	PVP-40
Polyvinylpyrrolidon (PVP-10) gjennomsnitts molarmasse 10 000 g/mol	Sigma-Aldrich	PVP-10
HNO ₃ 69% ²	-	-
HNO ₃ 3,5% ²	-	-
Tuning løsning ICP-MS 1 µg/L Ce, Co, Li, Mg, Ti og Y i 2% HNO ₃	Agilent Technologies	5185-5959
Au ioniskstandard 1001 ± 6 µg/mL i 2% HNO ₃	Spectrascan	SS-1118N
Ce ioniskstandard 1000 mg/L ± 2 mg/L i 5% HNO ₃	Sigma-Aldrich	16734
Zn ioniskstandard 1000 mg/L ± 2 mg/L i 2% HNO ₃	Sigma-Aldrich	18562
Zr ioniskstandard 1000 mg/L ± 3 mg/L i 2% HNO ₃ og 0,2% HF	Sigma-Aldrich	51244
Cu ioniskstandard 1000 mg/L ± 2 mg/L i 2% HNO ₃	Sigma-Aldrich	68921
Protease fra <i>Bacillus sp.</i>	Sigma-Aldrich	P0029

¹Ukjent leverandør.

²Destillert på lab.

Tabell 3.3 Instrument parametere for Agilent 7900 sp-ICP-MS med Autosampler SPS4

Parameter	Verdi
Radiofrekvenskraft	1550 W
Forstøvergass	1,05 L/min
Forstøver	Micromist
Pneumatiskpumpe	0,1 rps (runder per sekund)
Fakkell	1,5 mm
Tube ID	1,02 mm
Måleintervaller	100 µs (topp-integrering modus)
Isotoper målt	¹⁹⁷ Au, ⁶³ Cu, ¹⁴⁰ Ce, ⁶⁶ Zn og ⁹⁰ Zr
Analyse-tid per prøve	120 s
Rensing	Rens 1: 60 s 3,5% HNO ₃ Rens 2: 90 s Milli-Q® vann

3.2 Tillaging av blåskjellprøver

Partiet av blåskjell analysert i denne oppgaven kom fra HI sitt overvåkningsprosjekt av kommersielle blåskjell. I utgangspunktet ble blåskjellene benyttet for metodeutviklingsformål. Siden det er mangel på sertifisert referansematerialer av matrikser som inneholder nanopartikler, ble blåskjellprøvene spiket med NPer for å blant annet undersøke ekstraksjonen av NPer. Opparbeiding av prøver ble gjort basert på enzymprotokoll tidligere utprøvd på Au og Ag NPer. Som en utvidelse av oppgaven ble det også undersøkt om ulike prøver av blåskjell inneholdt NPer tatt opp fra miljøet. I denne utvidelsen ble blåskjell fra tre plasser inkludert. Are Sæle Bruvold som er en stipendiat ved Havforskningsinstituttet/UiB bidro med disse prøvene. Den ene partiet av skjell var selvplukket ved Vågen (Bergen), et annet parti var fra et dyrkningsanlegg og det siste partiet var fra det samme overvåkningsprosjektet som skjellene som opprinnelig ble benyttet for metodeutvikling. Selv om den ene gruppen av skjell var fra det samme overvåkningsprosjektet, antas det at de er fra forskjellige lokasjoner ettersom overvåkningsprosjektet tar inn skjell fra ulike lokasjoner og skjellene var fra ulike partier og tider.

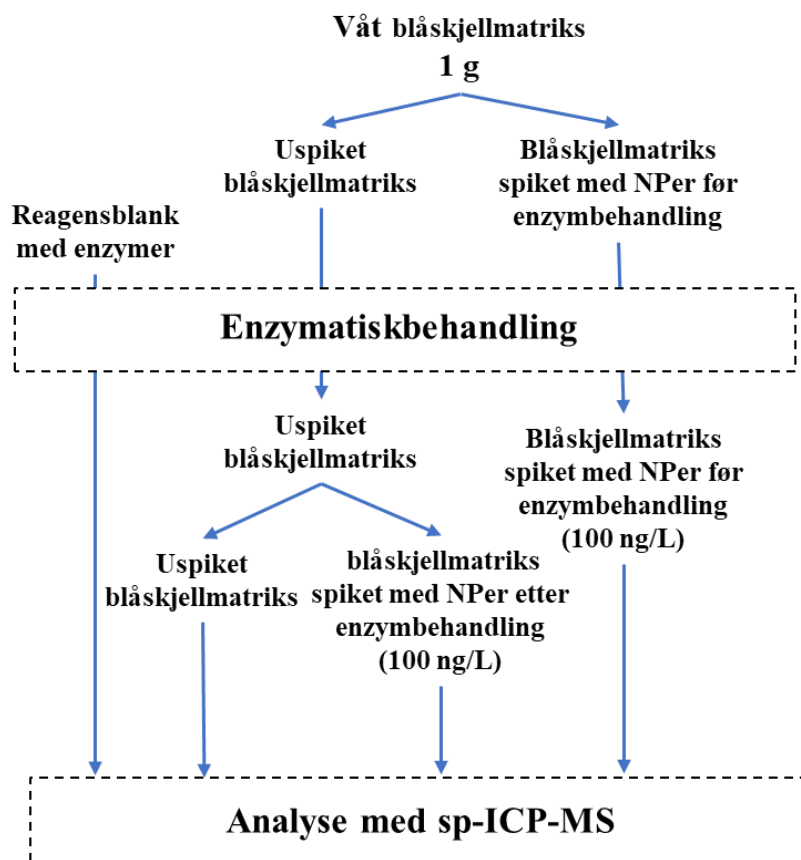
Skjellene ble behandlet etter Havforskningsinstituttet sin rutine for opparbeiding av blåskjell (Havforskningsinstituttet, 2019). Dypfryste blåskjell ble tint i lunket vann i en tett plastpose i 24 timer. Etter tining ble skjellene vasket for hånd under springen, hvor rur ble fjernet, skjellene ble holdt lukket under vaskingen slik at springvann ikke kom inn i skjellene. Skjellene ble deretter åpnet ved å kutte opp lukkemuskelen med en smørkniv, urenheter som sand ble deretter spylt vekk med destillert vann. Etter avrenning i 5 minutter på et fat med papir, ble innmaten til skjellene skrapet ut og overført til en sil for ytterligere avrenning i 5 minutter. Etter dette ble innmaten homogenisert over to runder, først med en kjøkkenblender (PHillips HR1371) etterfulgt av en homogenisator (POLYTRON System PT 2100). Partiet av blåskjell ment for metodeutvikling ble delt inn i fire ulike samleprøver, hvor hver samleprøve ble homogenisert til hvert sitt homogenat. Samleprøvene ble deretter satt til frysing i fire ulike plastprøvebegre frem til de skulle analyseres. Blåskjellene fra stipendiat Are Sæle Bruvold var opparbeidet av ham etter samme prosedyre, men i opparbeidingen ble et helt parti bestående av 25 blåskjell homogenisert til en samleprøve, i stedet for flere ulike.

3.3 Enzymbehandling

For å fordøye blåskjellmatriksen ble protease enzymer fra *Bacillus sp.* benyttet. Proteaser er av familien hydrolytiske enzymer. Enzymer som tilhører denne familien bryter opp molekyler ved å katalysere introduksjonen av vann til substrater. Proteaser katalyserer denne reaksjonen hos proteiner og peptider (Vale, Rial-Otero, Mota, Fonseca, & Capelo, 2008). Enzymbehandlingsmetoden som er blitt brukt i denne oppgaven er tidligere blitt validert hos Havforskningsinstituttet for ekstraksjon av Au NPer fra blåskjell (Valdersnes, Bienfait, Solli, & Bruvoll, 2020).

De ulike prøvetypene som ble behandlet med enzymekstraksjonen var vannblanker med Milli-Q[®] vann og våte blåskjellprøver både med og uten NPer spiket (figur 3.1). Enkelte blåskjellprøver ble spiket med NPer før enzymbehandlingen, mens andre ble spiket etter enzymbehandlingen. Dette ble gjort for å undersøke om enzymbehandlingen påvirket gjenvinningen av NPene. For enzymbehandlingen ble det laget enzymløsninger med en konsentrasjon på 200 g/L. Dette ble gjort ved å veie 10 g protease fra *Bacillus sp.* i en 50 mL målekolbe med Milli-Q[®] vann, tilsette ca. 30 ml Milli-Q[®] vann, løse opp enzymet og til slutt fylle opp til merket med Milli-Q[®] vann. Våte blåskjellprøver ble veid inn til ca. nøyaktig 1 g i 13 mL prøverør, og det ble tilsatt 100 µL NP-suspensjon (fra en 500 µg/L NP-suspensjon) eller ingenting, avhengig om det skulle være matriksprøve spiket med NPer eller en matriksblankprøve, henholdsvis. Reagensblankprøver ble tillagd ved å tilsette 1 mL Milli-Q[®] vann til et 13 mL prøverør istedenfor 1 g blåskjellprøve før disse ble videre tilsatt 100 µL Milli-Q[®] vann. De ulike prøvene ble deretter ristet godt for hånd og ved hjelp av en Wirlmixer. Videre ble 3 mL av 200 g/L enzymløsningen tilsatt til prøvene, og prøvene ble deretter ristet for hånd og med Wirlmixer igjen. Videre ble prøvene lagt på en varmerister på 300 rpm (runder per minutt) og 50 °C i 1 time. Etter dette ble prøvene som ble spiket med NP-suspensjon og reagensblankene tilsatt 3,9 mL Milli-Q[®] vann, for å så bli ristet for hånd og på Wirlmixer i 15 sekunder på full hastighet. Deretter ble umiddelbart 2 mL av prøvene fortynnet til 10 mL ved bruk av Milli-Q[®] vann i et nytt 13 mL prøverør. Prøvene ble deretter ristet forhånd og på Wirlmixer igjen i 15 sekunder på full hastighet. I det siste steget ble 1 mL av prøvene fortynnet til 12,5 mL med Milli-Q[®] vann i nye 15 mL prøverør, prøvene ble så ristet for hånd og på Wirlmixer i 15 sekunder på full hastighet, for å så bli analysert med sp-ICP-MS. Blåskjellprøvene som ikke ble tilsatt 100 µL NP-suspensjon ble delt i to etter varmebehandlingen, hvor 1 mL fra prøvene ble overført til hvert sitt 13 mL prøverør. En av prøvene på 1 mL ble videre tilsatt 25 µL NP-suspensjon (fra 500 µg/L NP-suspensjon) og ble

videre ristet for hånd og på Wirlmixer i 15 sekunder på full hastighet. Begge prøvene (både den med NPer og den uten) ble så fortynnet til 10 mL, og ble igjen ristet for hånd og på Wirlmixer i 15 sekunder på full hastighet. Til slutt ble 1 mL fra begge prøvene fortynnet til 12,5 mL i nye 15 mL prøverør. Prøvene ble videre ristet for hånd og på Wirlmixer i 15 sekunder på full hastighet før analysen med sp-ICP-MS. Ved denne fremgangsmåten for fortynning ble alle prøvene fortynnet 500 ganger, noe som gir en NP slutt konsentrasjon på 100 ng/L i de spikete blåskjellprøvene.



Figur 3.1 skjematisk gjennomgang av enzymbehandlingen. Prøvene ble fortynnet 500 ganger med Milli-Q® vann.

3.4 Tillaging av stabiliserte og ustabiliserte NP-stamsuspensjoner

Alle analysene av spikete NP-prøver tok utgangspunkt i NP-stamsuspensjoner som de aktuelle NP-prøvene ble fortynnet ut ifra. Ettersom Au NPene ble kjøpt som ferdige suspensjoner med en konsentrasjon på 50 mg/L, var det ikke nødvendig å lage stamsuspensjon for Au NP-ene. Det ble benyttet 50 mg/L 60 nm Au NPer fra to ulike leverandører i prosjektet, den ene leverandøren var PerkinElmer den andre leverandøren var NanoComposix. Stamsuspensjoner av metalloksid-NPene ble enten lagd av NPer i pulverform eller fra høyere konsentrerte NP-leverandørsuspensjoner. Det ble også forsøkt å stabilisere enkelte NP-stamsuspensjoner med stabilisatorer av: PVP-10, PVP-40, natriumsitrat, sitronsyre og eddiksyre. Tidligere i prosjektet ble hovedsakelig 50 mg/L stamsuspensjoner laget, men senere i prosjektet ble det laget 500 mg/L stamsuspensjoner i stedet for, for å få et mer praktisk innveingssteg.

3.4.1 Kobber(II)oksid <50 nm nanopartikler

CuO NPer på <50 nm i pulverform ble benyttet til å lage 50 mg/L stamsuspensjoner. Stamsuspensjonen ble laget ved å veie inn ca. nøyaktig 0,1 g av CuO NP-pulveret i en 2 L flaske. Flasken ble videre tilsatt 2 L Milli-Q[®] vann ved bruk av ett 1 L målesylinder. For dispergere NPene ble flasken behandlet med ultralydvannbad (frekvens 40 kHz) i 60 minutter.

CuO NPer ble også forsøkt stabilisert med PVP-40, PVP-10, sitronsyre og natriumsitrat. Fire ulike 50 mg/L CuO NP-stamsuspensjoner ble laget med et stabilisator innhold på 0,1%. Suspensjonene ble laget ved å veie inn 0,05 g av PVP-40, PVP-10, sitronsyre og natriumsitrat i hver sin 50 mL målkolbe. Kolbene ble så fylt opp til menisken med 50 mg/L CuO NP-suspensjon, fra en tidligere laget 2 L stamsuspensjon. Suspensjonene med stabilisator ble behandlet med ultralydvannbad i 40 minutter (frekvens 40 kHz).

3.4.2 Zink(II)oksid <100 nm nanopartikler

Stamsuspensjoner med ZnO NPer ble laget fra en leverandørsuspensjon med <100 nm ZnO NPer i vann. NP innholdet i leverandørsuspensjonen var oppgitt å være 20% (vekt %). En 50 mg/L stamsuspensjon ble laget ved å veie inn ca. nøyaktig 0,25 g av leverandørsuspensjonen. Den innveide mengden av leverandørsuspensjon ble videre overført til en 1 L målkolbe, og målekolben ble deretter fylt opp til menisken med Milli-Q[®] vann.

3.4.3 Zirkonium (IV)oksid <100 nm nanopartikler

Stamsuspensjoner med ZrO_2 NPer ble laget fra en leverandørsuspensjon med <100 nm ZrO_2 NPer i vann, NP innholdet var oppgitt å være 5% (vekt %). Stamsuspensjoner på 50 mg/L ble laget ved å veie inn ca. nøyaktig 1 g av leverandørsuspensjonen i en 1 L målkolbe, kolben ble videre fylt til menisken ved bruk av Milli-Q[®] vann. Stamsuspensjoner ble også laget i 100 mL målkolber, hvor ca. nøyaktig 0,1 g fra leverandørsuspensjonen ble veid inn og fortynnet med Milli-Q[®] vann, for å gi en konsentrasjon på 50 mg/L. Enkelte stamsuspensjoner ble også laget i 50 mL prøverør hvor stamsuspensjoner med en konsentrasjon på 500 mg/L ble laget. Dette ble gjort ved å veie inn ca. nøyaktig 0,3 g av leverandørsuspensjonen og videre fortynne suspensjonen til 30 mL med Milli-Q[®] vann.

Enkelte ZrO_2 NP-stamsuspensjoner ble også forsøkt stabilisert med natriumsitrat som stabilisator. Dette ble gjort ved å lage ZrO_2 NP-stamsuspensjoner med 0,1% og 0,5% natriumsitrat. NP-stamsuspensjoner på 50 mg/L med 0,1% natriumsitrat ble laget ved å veie inn 0,1 g natriumsitrat i 100 mL målkolber. Den innveide mengden natriumsitrat ble oppløst med 100 mL Milli-Q[®] vann sammen med ca. nøyaktig 0,1 g NP-suspensjon (fra leverandørsuspensjonen). En stamsuspensjon på 50 mg/L med 0,5% natriumsitrat i en 100 mL målkolbe ble laget på samme vis, bare at 0,5 g natriumsitrat ble tilsatt i stedet for 0,1 g. Det ble også laget stamsuspensjoner på 500 mg/L med 0,1% natriumsitrat. Disse ble laget ved å veie inn ca. nøyaktig 0,3 g av leverandørsuspensjonen i 50 mL prøverør. Den innveide mengden leverandørsuspensjon ble videre fortynnet til 30 mL med en ferdiglaget løsning av 0,1% natriumsitrat. Løsningen av natriumsitrat som ble benyttet til å lage den stabiliserte 500 mg/L stamsuspensjonen ble laget ved å oppløse 0,2 g natriumsitrat med 200 mL Milli-Q[®] vann i en 200 mL målkolbe.

3.4.4 Ce(IV)oksid <50 nm nanopartikler

En 500 mg/L CeO_2 NP-stamsuspensjon ble laget fra <50 nm CeO_2 NP-pulver. Stamsuspensjonen ble laget ved å veie inn ca. nøyaktig 0,1 g CeO_2 NP-pulver i en 200 mL målekolbe. Målekolben ble videre tilsatt 200 mL Milli-Q[®] vann. For å dispergere NPene ble stamsuspensjonen behandlet med ultralydvannbad i 60 minutter (frekvens 40 kHz).

3.4.5 Ce(IV)oksid 30-50 nm nanopartikler

En leverandørsuspensjon med 30-50 nm CeO₂ NPer i 2,5% eddiksyre, med et NP-innhold på 20% (vekt %), ble benyttet til å lage stamsuspensjoner. Stamsuspensjoner på 500 mg/L ble laget i 100 mL målekolber eller 50 mL prøverør. Ved tillaging av 500 mg/L stamsuspensjonene i 100 mL målekolber ble ca. nøyaktig 0,25 g av leverandørsuspensjonen veid inn i målekolber. Videre ble den innveide mengden av leverandørsuspensjonen fortynnet med Milli-Q[®] vann til 100 mL. For stamsuspensjonene laget i 50 mL prøverør ble ca. nøyaktig 0,1 g av leverandørsuspensjonen veid inn og videre fortynnet til 40 mL med Milli-Q[®] vann, for å gi en konsentrasjon på 500 mg/L.

Ettersom leverandørsuspensjonen inneholdt 2,5% eddiksyre, ble det forsøkt å stabilisere enkelte stamsuspensjoner med 2,5% eddiksyre. Stamsuspensjoner på 500 mg/L i 50 mL prøverør med 2,5% eddiksyre ble laget ved å fortynne den innveide mengden av leverandørsuspensjon med 2,5% eddiksyre, i stedet for Milli-Q[®] vann.

3.5 Bestemmelse av nanopartikler ved sp-ICP-MS

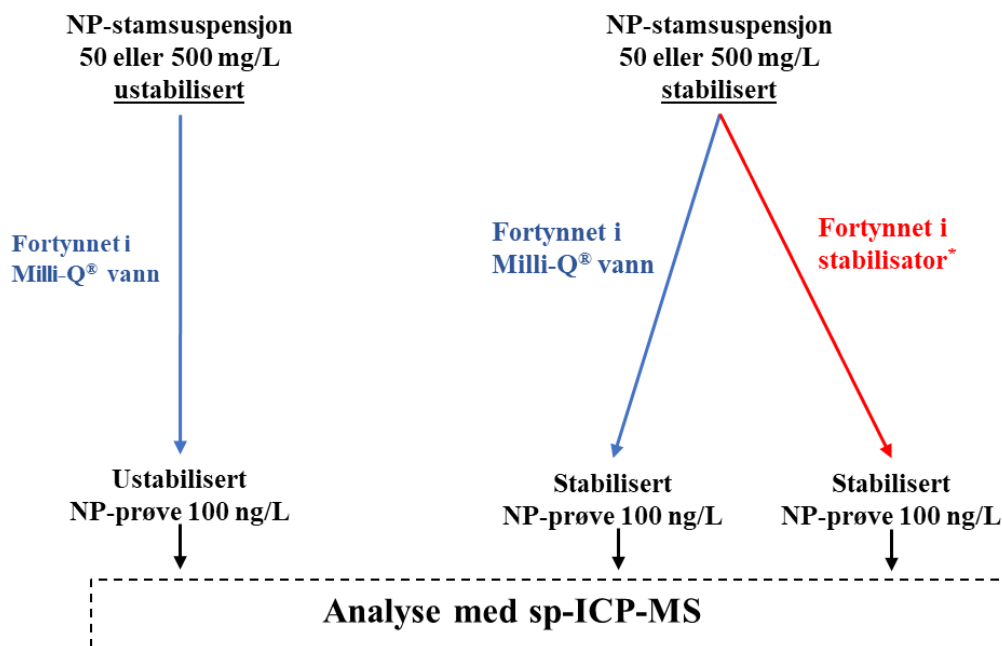
Analysene av NPer med sp-ICP-MS ble enten gjort i enkeltelementmodus, hvor en analytt med en spesifikk m/z verdi ble analysert, eller i multielementmodus hvor ulike analytter ble målt ved ulike m/z verdier. I multielement modus blir ikke ulike m/z verdier målt samtidig, men instrumentet bytter mellom m/z verdier under prøvesekvensen. Eksempelvis kan én m/z verdi bli målt i 2 minutter før instrumentet bytter til en ny m/z verdi som blir målt i 2 minutter. I begge analysemodusene ble det analysert et NP-referansemateriale, en ionisk standard for referansematerialet, en ionisk blank, en ionisk standard for analyttene og prøver med analyttene av interesse. I analysene ble det benyttet sfæriske 60 nm Au NPer som NP-referansemateriale, mens en 10 µg/L ionisk Au løsning ble benyttet som ionisk standard for referansematerialet. De ioniske blankene var 10 mL Milli-Q[®] vann prøver, mens de ioniske standardene for analyttene var 10 µg/L ioniske løsninger av metallet i NPer som ble analysert (f.eks. ble en ionisk standard av Ce benyttet for CeO₂ NPer). Før hver analysesekvens ble ICP-MS instrumentet tunet med en 1 µg/L tuningløsning av Ce, Co, Li, Mg, Ti og Y. Hver prøve ble analysert i 120 sekunder, hvor instrumentet ble rensert mellom hver prøve med 3,5% HNO₃ i 60 sekunder og Milli-Q[®] vann i 90 sekunder. Mellom ca. hver tredje prøve ble også en blankprøve med Milli-Q[®] vann analysert. På instrumentet ble prøvene analysert i en sekvens fra lavest analyttinnhold til høyest, dette ble gjort i et forsøk på å unngå forurensing av instrumentet og

overføringer av NPer og ioner fra høyere konsentrerte prøver til lavere konsentrerte prøver. Prøvene med NPer ble analysert i et konsentrasjonsområde fra 100 ng/L – 1 µg/L, men konsentrasjonen på de fleste prøvene var 100 ng/L. I analysen ble det brukt måleintervaller på 100 µs og prøvene ble målt i 2 minutter, som resulterte i 1,2 millioner datapunkter per prøve.

3.5.1 Fortynning av nanopartikkelprøver

Au 60 nm NP-referansematerialet og de aktuelle NP-prøvene ble hovedsakelig fortynnet fra en 50 mg/L stamsuspensjon til en 100 ng/L prøve som ble analysert med sp-ICP-MS. Dette ble gjort gjennom en trestegs fortynningsprosess med Milli-Q[®] vann i 15 mL prøverør (figur 3.2). For stamsuspensjonene på 500 mg/L ble dette en firestegs fortynningsprosess, hvor prøvene først ble fortynnet til 50 mg/L. Dette ble gjort ved å fortynne 1 mL av 500 mg/L stamsuspensjonen til 10 mL. Fra 50 mg/L stamsuspensjoner ble 100 µL fortynnet til 10 mL, som gav en konsentrasjon på 500 µg/L. Videre ble 100 µL av 500 µg/L suspensjonen fortynnet til 10 mL, som gav konsentrasjonen 5 µg/L. Til slutt ble 200 µL av 5 µg/L suspensjonen fortynnet til 10 mL, som gav en konsentrasjon på 100 ng/L. For å få prøver på 200 ng/L og 500 ng/L ble henholdsvis, 400 µL og 1 mL av 5 µg/L suspensjonen fortynnet til 10 mL. Prøver på 1 µg/L ble laget ved å fortynne 2 mL av 5 µg/L suspensjonen til 10 mL. NP-suspensjonen på 500 µg/L i fortynningsserien ble benyttet til å spike blåskjellprøver (kapittel 3.2).

Det ble også forsøkt å fortynne enkelte stabiliserte stamsuspensjoner med stabilisator i stedet for Milli-Q[®] vann (figur 3.2). Når dette ble gjort for ZrO₂ NP-stamsuspensjoner stabilisert med 0,1% natriumsitrat, ble 0,1% natriumsitrat benyttet gjennom tre-/firestegs fortynningsprosessen istedenfor Milli-Q[®] vann. Det samme ble testet for CeO₂ NP-stamsuspensjoner stabilisert med 2,5% eddiksyre, hvor 2,5% eddiksyre ble benyttet gjennom tre-/firestegs fortynningsprosessen istedenfor Milli-Q[®] vann.



Figur 3.2 skjematisk representasjon av fortynning av NP-stamsuspensjon til 100 ng/L NP-prøver. *Fortynnet i 2,5% eddiksyre eller 0,1% natriumsitrat.

3.5.2 Fortynning av ioniske standarder.

De ioniske standardene for analyttene og referansematerialet ble hovedsakelig fortynnet gjennom en trestegs fortynningsprosess (fra 1000 mg/L til 10 µg/L) ved bruk av Milli-Q® vann eller 1,7% HNO₃ i 15 mL prøverør. Au, Cu og Zn ioniske standarder ble fortynnet i Milli-Q® vann, men Zr og Ce ioniske standarder ble fortynnet i 1,7% HNO₃. Det ble benyttet 1,7% HNO₃ ettersom at det ble oppdaget hos andre som jobbet med nanopartikler ved HI at Ti ioniske standarder var mer stabile/gav bedre signaler med 1,7% HNO₃. Dersom de ioniske standardene ble fortynnet i 1,7% HNO₃ ble det benyttet ioniske blanker med 1,7% HNO₃, i stedet for rent Milli-Q® vann.

Fra 1000 mg/L ioniske løsninger ble 100 µL fortynnet til 10 mL, noe som gav en konsentrasjon på 10 mg/L. Videre ble 100 µL av 10 mg/L løsningen fortynnet til 10 mL igjen, som gav en konsentrasjon på 100 µg/L. Til slutt ble 1 mL av 100 µg/L løsningen fortynnet til 10 mL, noe som gav en konsentrasjonen 10 µg/L. Hovedsakelig ble prøver på 10 µg/L benyttet for kalibrering i analysene. Men i enkelte analyser ble ioniske standarder med en konsentrasjon på 100 ng/L, 0,5 µg/L og 1 µg/L laget for å undersøke lineariteten til standardene. Standardene på 0,5 µg/L og 1 µg/L ble laget ved å fortynne henholdsvis, 50 µL og 100 µL av 100 µg/L løsningen til 10 mL. Standarden på 100 ng/L ble laget ved å fortynne 1 mL av 1 µg/L prøven til 10 mL.

3.5.3 Analyse av gull 60 nm nanopartikler

Au NPer ble analysert i enkeltelementmodus ved en m/z -verdi på 197. Au NPene ble hovedsakelig målt for å bestemme TE, men det ble også foretatt analyser hvor Au ble analysert som en vanlig NP-analytt. I analysen ble det analysert ulike enzymbehandlede blåskjellprøver med og uten Au NPer spiket. Det ble analysert blåskjellprøver spiket med NPer før enzymbehandlingen og blåskjellprøver spiket etter enzymbehandlingen (NP konsentrasjon 100 ng/L). Au NPer ble også analysert i Milli-Q[®] vann ved en konsentrasjon på 100 ng/L.

3.5.4 Analyse av kobber(II)oksid <50 nm nanopartikler

CuO NPer ble analysert i enkeltelementmodus ved en m/z -verdi på 63. Prøvene som ble analysert var ustabiliserte (100 ng/L, 200 ng/L og 500 ng/L) og stabiliserte (100 ng/L og 1 µg/L). De stabiliserte prøvene var stabilisert ved stamsuspensjonen på 50 mg/L (se kap. 3.4.1), men ble videre fortynnet i Milli-Q[®] vann fram til en konsentrasjon på 100 ng/L og 1 µg/L. De ulike stabilisatorene som ble benyttet var 0,1% PVP-10, PVP-40, sitronsyre og natriumsitrat. Før analyse ble alle stamsuspensjoner (stabiliserte og ustabiliserte) behandlet med et ultralydvannbad i 60 minutter (frekvens 40 kHz) for å dispergere NPene.

3.5.5 Analyse av sink(II)oksid <100 nm nanopartikler

ZnO NPer ble analysert sammen med ZrO₂ NPer ved bruk av multielementmodus. Prøvene med ZnO NPer hadde en konsentrasjon på 100 ng/L og 200 ng/L, og ble målt ved en m/z på 66.

3.5.6 Analyse av zirkonium(IV)oksid <100 nm nanopartikler

ZrO₂ NPer ble analysert både ved enkeltelement- og multielementmodus sammen med ZnO <100 nm og CeO₂ 30-50 nm NPer. Ustabiliserte ZrO₂ prøver (100 ng/L) og natriumsitrat-stabiliserte prøver (100 ng/L) ble analysert ved m/z 90. De stabiliserte prøvene var stabilisert ved stamsuspensjonen med et stabilisatorinnhold på 0,1% eller 0,5% natriumsitrat. Enkelte stabiliserte NP-stamsuspensjoner ble fortynnet i Milli-Q[®] vann frem til 100 ng/L prøvene som skulle analyseres. Det ble også forsøkt å fortynne enkelte stabiliserte NP-stamsuspensjoner frem til 100 ng/L med 0,1% natriumsitrat i stedet for Milli-Q[®] vann. Det ble også analysert enzymbehandlede blåskjellprøver uten NPer tilsatt og spikete blåskjellprøver med NPer (100

ng/L). ZrO₂ NPer benyttet til å spike blåskjellene var stabiliserte med 0,1% natriumsitrat , men de spikete blåskjellprøvene ble videre fortynnet i Milli-Q[®] vann etter spikingen av NPer. Det ble analysert blåskjellprøver med stabiliserte ZrO₂ NPer spiket både før og etter enzymbehandlingen. Reagensblanker som inneholdt enzym ble også analysert. I multielementanalysene ble det analysert blåskjellprøver hvor ustabiliserte CeO₂ 30-50 nm NPer og stabiliserte ZrO₂ NPer ble spiket i en og samme matriks.

3.5.7 Analyse av cerium(IV)oksid <50 nm nanopartikler

NPer av CeO₂ på <50 nm ble analysert i enkeltelementmodus ved en m/z på 140. For å dispergere NPene før analyse ble stamsuspensjoner behandlet med et ultralydvannbad i 60 minutter (frekvens 40 kHz). Prøvene ble analysert ved en konsentrasjon på 100 ng/L.

3.5.8 Analyse av cerium(IV)oksid 30-50 nm nanopartikler

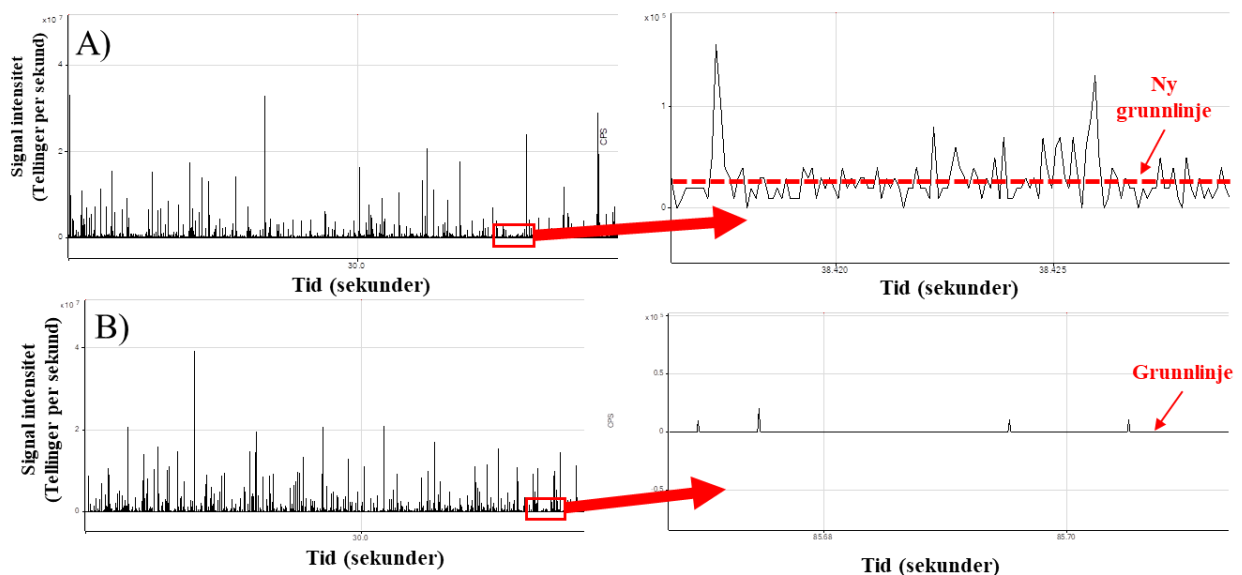
CeO₂ NPer på 30-50 nm ble analysert både i enkeltelementmodus og multielementmodus ved en m/z på 140. Prøvene ble analysert ved en konsentrasjon på 100 ng/L. Det ble analysert ustabiliserte og stabiliserte prøver med 2,5% eddiksyre. De stabiliserte prøvene ble stabilisert med 2,5% eddiksyre ved tillagingen av stamsuspensjon, og ble videre fortynnet i 2,5% eddiksyre, istedenfor Milli-Q[®] vann, frem til en endelig konsentrasjon på 100 ng/L. Blåskjellprøver ble analysert både med og uten NPer spiket slik at sluttkonsentrasjonen ble 100 ng/L. Det ble analysert blåskjellprøver som ble spiket før enzymbehandlingen og blåskjellprøver som ble spiket etter enzymbehandlingen. For å spike blåskjellene ble det benyttet både ustabiliserte og 2,5% eddiksyre-stabiliserte CeO₂ NPer. I multielementanalysen ble ustabiliserte CeO₂ NPer og 0,1% natriumsitrat-stabiliserte ZrO₂ NPer spiket i de samme blåskjellprøvene, med en sluttkonsentrasjon for begge NPene på 100 ng/L.

3.5.9 Analyse av cerium og zirkonium nanopartikler i blåskjell

Uspikete blåskjellprøver ble analysert for både Ce og Zr i enkeltelementmodus og multielementmodus ved en m/z verdi på 140 og 90, respektivt. I tillegg til blåskjellprøver, ble det analysert reagensblanker med enzymer.

3.6 Behandling av data fra sp-ICP-MS

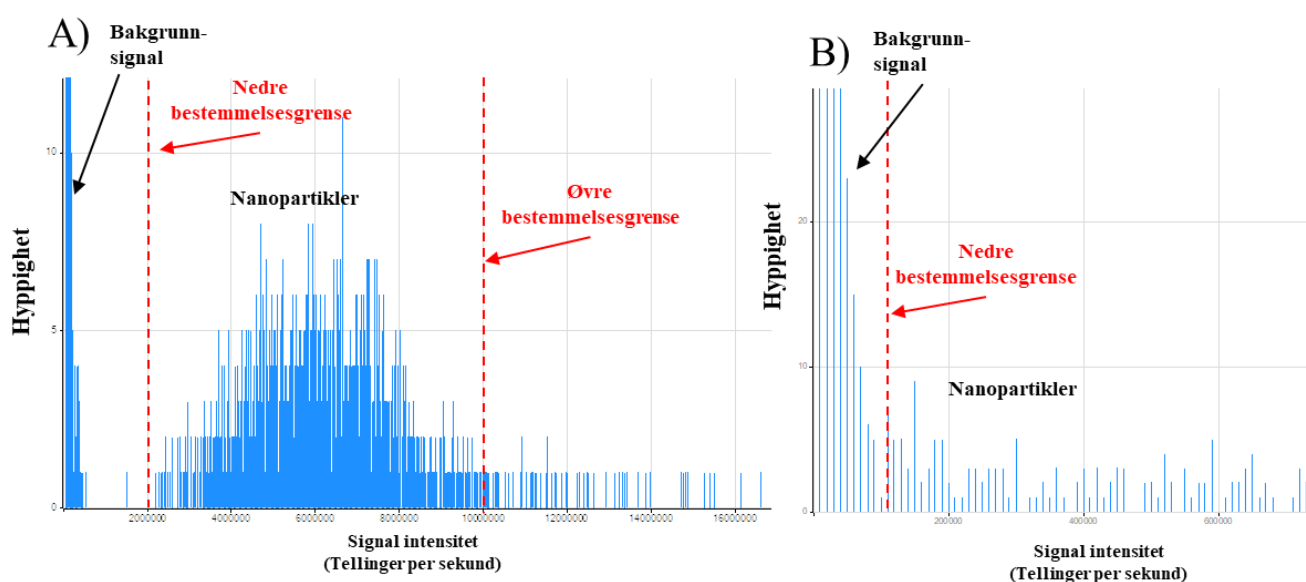
Rådataene fra sp-ICP-MS instrumentet ble behandlet med MassHunter-programvaren (Agilent Technologies, versjon 4.5). I behandlingen av data er to prosesser sentrale: valg av størrelsebestemmelsesgrensen («Particle Detection Threshold») og valg av grunnlinjen («Particle Baseline»). En størrelsebestemmelsesgrense og grunnlinje må velges for NP-referansematerialet og prøvene med analyttene av interesse. Som nevnt i kap. 2.4.2 får man et tidsoppløst råsignalplott ved analyse av NP-prøver, hvor NP-signaler forekommer som pulser over en kontinuerlige bakgrunn. Dersom det var mye bakgrunnssignaler i et råsignalplott ble en ny grunnlinje satt over den høye bakgrunnen (figur 3.3 A). Ved mindre bakgrunnssignaler ble grunnlinjen satt til 0 tellinger per sekund (figur 3.3 B). Alle signalene som var over grunnlinjen ble videre prosessert til et signalintensitetshistogram av programvaren (figur 3.4).



Figur 3.3 Råsignalplott av NP målinger skjermdump fra MassHunter-programvaren (Agilent Technologies, versjon 4.5) A) viser en situasjon med mye bakgrunnssignaler hvor en ny grunnlinje settes. B) Viser en situasjon med lite bakgrunnssignaler hvor grunnlinjen er satt til 0 tellinger per sekund.

Størrelsebestemmelsesgrensen ble nevnt i kap. 2.4.2, ved denne grensen bestemmer man hva som skal kvantifiseres som NPer i signalintensitetshistogrammet. Ved analyse av vanlige NP-prøver ble denne satt som en nedre grense hvor bakgrunnssignalene avtar (figur 3.4 B), i dette tilfellet vil alle signalene over den nedre grensen kvantifiseres som NPer. Ved analyse av 60 nm Au NP-referansematerialet for bestemmelse av TE, ble størrelsebestemmelsesgrensen satt som en nedre og en øvre grense (figur 3.4 A). I dette tilfellet vil NPer som er i intervallet mellom den øvre og den nedre grensen bli kvantifisert som NPer. Au NP-referansematerialet ble

benyttet for å beregne TE ved bruk av partikkelstørrelsemetoden (se kap. 2.4.2 og 2.4.3). Ved bruk av partikkelstørrelsemetoden blir det tatt utgangspunkt i at NP-referansematerialet er 60 nm, det er dermed NPene på 60 nm som er av interesse. Ved analyse av Au NPene får man en hovedfordistribusjon i signalintensitetshistogrammet hvor de fleste NP-signalene befinner seg, det forventes at denne hovedfordistribusjonen består av NPene som har en størrelse i nærheten av 60 nm. Ved å sette et intervall som størrelsebestemmelsesgrense kan man ekskludere NPene som er utenfor hovedfordistribusjonen og trolig ikke er 60 nm, slik at de ikke inkluderes i beregningen av TE. Signalintensitetshistogrammene ser ulik ut for Au 60 nm NPene (figur 3.4 A) og ZrO₂ <100 nm NPene (figur 3.4 B). Dette kommer av at Au NPene er mer monodispers hvor NPene har tilnærmet lik størrelse og har følgelig tilnærmet like signalintensiteter, dette resulterer i en tydelig hovedfordistribusjon hvor de fleste Au NPene befinner seg. ZrO₂ NPene er derimot mer polydispers, og har mange ulike størrelser, noe som ikke gir en like markant hovedfordistribusjon i signalintensitetshistogrammet. Etter størrelsebestemmelsesgrensen er satt, enten som et intervall eller en nedre grense, blir alle NPene innenfor intervallet eller over den nedre grensen kvantifisert, hvor man får informasjon om: partikkelantallet, partikkelantallkonsentrasjonen, massekonsentrasjonen til partiklene og størrelsen til partiklene. Ved analyse av NPene får man også en totalkonsentrasjon, som inkluderer analytten i oppløst og partikkelform, men denne verdien er uavhengig av hvordan man setter størrelsebestemmelsesgrensen.



Figur 3.4 signalintensitetshistogram til NP-Prøver. skjermdump fra MassHunter-programvaren (Agilent Technologies, versjon 4.5). A) Viser signalintensitetshistogrammet til Au NP-referansemateriale hvor størrelsebestemmelsesgrensen er satt som et intervall B) Viser signalintensitetshistogrammet til en ZrO₂ NP-prøve hvor størrelsebestemmelsesgrensen er satt som en nedre grense.

3.7 Analyse av nanopartikler med elektronmikroskop (SEM og TEM)

3.7.1 Analyse med SEM

Ved SEM-analyse ble instrumentet Zeiss Supra 55 VP benyttet med en spenning på 5 kV. NP-suspensjoner på 50 mg/L av Au 60 nm, ZrO₂ <100 nm i 0,1% natriumsitrat, CeO₂ 30-50 nm, CeO₂ <50 nm og CuO <50 nm ble analysert med SEM. For SEM-analysen ble en dråpe av NP-suspensjonene pipettert på et preparatglass, videre sto preparatglassene på tørk inntil væsken fra suspensjonene var fordampet vekk. Preparatglasset med NPer ble så belagt med karbon (via Agar Turbo Carbon Coater) før prøvene ble analysert med SEM. Analysene ble gjort med assistanse av Irene Heggstad (institutt for geovitenskap, UiB). Størrelsen til NPer i enkelte SEM-bilder ble målt manuelt via applikasjonen ImageJ (versjon 1.52a) (dersom kvaliteten til bildene tillot det). I ImageJ (versjon 1.52a) ble et måleverktøy kalibrert mot målestokken gitt i SEM-bildene. Videre ble en og en NP målt om gangen manuelt med måleverktøyet.

3.7.2 Analyse med TEM

For TEM-analysene ble instrumentet JEOL JEM-2100 benyttet med en spenning på 160 kV. Suspensjoner av Au NP-er (PerkinElmer) og 0,1% natriumsitrat-stabiliserte ZrO₂ NPer på 50 mg/L ble analysert via TEM. For TEM-analysen ble en dråpe av NP-suspensjonene pipettert på en kobberrist. Kobberisten ble stående på benken til tørk inntil NP-suspensjonene var tørket inn. Videre ble kobberisten med prøvematerialet montert på en prøveholder for å så bli analysert med TEM. Analysen ble foretatt av stipendiat Are Sæle Bruvold (Havforskningsinstituttet/UiB) og Irene Heggstad (institutt for geovitenskap, UiB) ettersom at instrumentet ikke fungerte når det var planlagt å bruke det. For å måle størrelsen til NP-ene på TEM-bildene ble ImageJ applikasjonen (versjon 1.52a) benyttet på likt vis som ved analysen av SEM-bildene (kap. 3.7.1).

3.8 Kvalitetssikring og kvalitetskontroll

Kvalitetskontroll er grep som blir gjort for å sikre den daglige kvaliteten av enkeltmålinger eller en rekke enkeltmålinger. Det benyttes for å kartlegge om variasjonen i resultater er innenfor den forventede variasjonen. Vanlige metoder for kvalitetskontroll er eksempelvis måling av blanker, kontrollprøver (for kontrollkort), paralleller og blindprøver. Deltagelse i ringtester er også en hensiktsmessig måte å kontrollere labens prestasjoner på (Prichard & Barwick, 2007).

I denne oppgaven er det blitt benyttet paralleller, instrumentblanker (prøver med bare Milli-Q[®] vann) og reagensblanker (prøver med reagenser, men uten prøvematerialet). Blanker er blitt benyttet for å undersøke blankens bidrag for analyttene målt i prøvematerialet. Paralleller er blitt benyttet for å undersøke om variasjonen mellom paralleller er akseptabel. Au NPene benyttet som referansemateriale er også blitt sammenlignet mot tidligere resultater fra en validering, for å undersøke om det blir oppnådd forventede resultater.

I denne oppgaven er det også benyttet ioniske standarder for kalibrering som er sertifiserte referansematerialer, hvor standardene har sertifikater som redegjør for både metrologisk sporbarhet og usikkerhet knyttet til de spesifiserte verdiene. Imidlertid har mange av nanomaterialene benyttet i denne oppgaven manglende sporbarhet og mange nevner heller ikke noe om den assosierte usikkerheten til gitte verdier (vedlegg 2.1-2.6). Størrelsen til mange av nanomaterialene er blitt karakterisert med TEM, men det blir ikke nevnt hvor mange målte partikler som utgjør grunnlaget for den spesifiserte størrelsen. Størrelsen til partiklene blir også ofte nevnt som et intervall (f.eks. <100 nm) som ikke gir mye informasjon om størrelsesfordelingene til partiklene. Som påpekt av Meermann og Nischwitz (2018) er det en generell mangel på veldefinerte NP-standarder. Med slike spesifikasjoner for NPene er det en usikkerhet knyttet til hvilke resultater man kan forvente ved bestemmelse av NPene.

3.9 Formler

Standardavvik, SD (formel 3.1)

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

x_i : Enkelt målinger

\bar{x} : Gjennomsnitt av målinger

n : Antallet målinger

Relativt standardavvik, $RSD(\%)$ (formel 3.2)

$$RSD\% = \frac{SD}{\bar{x}} \cdot 100$$

SD : Standardavvik

Måleusikkerhet(%), 95% sikkerhet, $MU(95\%)$ (formel 3.3)

$$MU(95\%) = (RSD\% \cdot 2) + 5\%$$

$RSD\%$: Relativt standardavvik

5% er lagt til for å gjøre opp for mangel av sertifikat.

Gjenvinning(%), formel (3.4)

$$Gjenvinning(\%) = \frac{\text{Målt verdi}}{\text{Teoretisk verdi}} \cdot 100$$

Deteksjonsgrense, LOD formel (3.5)

$$LOD = \bar{X}_b + (3 \cdot SD)$$

\bar{X}_b : Gjennomsnittsmålinger av en egnet blankprøve.

Kvantifiseringsgrense, LOQ formel (3.6)

$$LOQ = 3 \cdot LOD$$

LOD : Deteksjonsgrense

3.10 Statistiske metoder

Variasjonsanalyse (ANOVA) er en statistiske metode som tester om gjennomsnittet til to eller flere grupper er ulike. Metoden tester en nullhypotese som sier at gjennomsnittet for de ulike gruppene er identiske. En statistisk signifikant ANOVA påpeker at alle gjennomsnittene ikke er like, hvor et eller flere gjennomsnitt er ulike (Wiley & Wiley, 2020). I denne oppgaven er enveis ANOVA blitt benyttet. Ved denne formen for ANOVA blir gjennomsnittene sammenlignet under innflytelse av én faktor (Hibbert & Gooding, 2020).

ANOVA forutsetter lik varians og normalitet (Wiley & Wiley, 2020). For testing av homogen varians er det benyttet Brown-Forsythe test, mens normaliteten av residualene ble testet med fire ulike tester: Anderson-Darling-, D'Agostino-Pearson omnibus-, Shapiro-Wilk- og Kolmogorov-Smirnov test. Dersom kravet til normalitet og lik varians ikke var oppfylt ble dataene log-transformert. ANOVA-testene ble videre gjennomført på dataene som var normalfordelte og hadde homogen varians. Dersom ANOVA-testen gav signifikante resultater ble Tukey post hoc test benyttet for å finne spesifikt hvilke grupper som var ulike fra hverandre. ANOVA analysene ble gjennomført med GraphPad Prism (versjon 9.0.1).

4. Resultater

4.1 Gull 60 nm nanopartikler

4.1.1 sp-ICP-MS

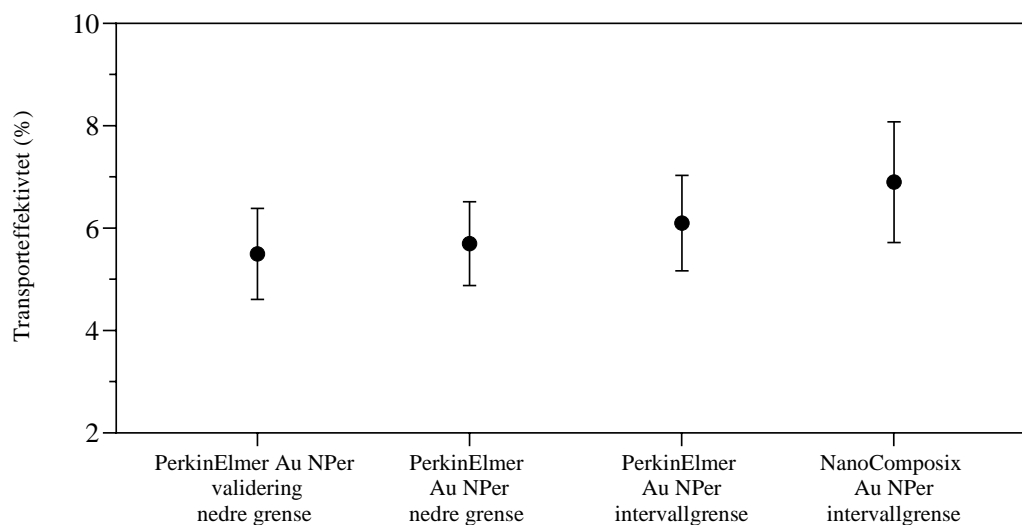
Vist i tabell 4.1 er resultatene fra analysene av 100 ng/L Au NP-referansemateriale på 60 nm fra to ulike leverandører: PerkinElmer og NanoComposix. For sammenligning er det også blitt inkludert resultater fra en metodevalidering for ekstraksjon av Au NPer fra blåskjellmatriks med enzymer. I valideringsarbeidet er det blitt benyttet Au NPer fra PerkinElmer. Valideringen er blitt gjennomført tidligere ved HI av andre analytikere/operatører. Ved analyse av NPer kan man som nevnt i kap 3.6 sette størrelsebestemmelsesgrensen i programvaren som en nedre grense, eller en øvre og nedre grense, som gir et intervall. I dette prosjektet er det blitt benyttet et intervall som grense for referansematerialene ved beregning av TE, imens i valideringen er det blitt brukt en nedre grense. For å få sammenlignbare resultater med valideringen er det blitt inkludert resultater for PerkinElmer NPene hvor størrelsebestemmelsesgrensen er satt som en nedre grense.

Med en nedre størrelsebestemmelsesgrense gav PerkinElmer NPene et partikkelantall på 811 partikler, massekonsentrasjon på 45 ng/L, totalkonsentrasjon på 50 ng/L. Dette samsvarer med valideringsresultatene hvor partikkelantallet, massekonsentrasjonen og totalkonsentrasjonen var på 813 partikler, 46 ng/L og 51 ng/L, respektivt. Når et intervall ble benyttet istedenfor en nedre størrelsebestemmelsesgrense gav PerkinElmer NPene lavere målinger med et partikkelantall på 749 partikler, massekonsentrasjon på 39 ng/L og totalkonsentrasjon på 50 ng/L. NanoComposix NPene gav høyere verdier enn PerkinElmer NPene med et partikkelantall på 1451 partikler, massekonsentrasjon på 66 ng/L og totalkonsentrasjon på 75 ng/L. De ulike størrelsesparameterne (gjennomsnitt, median og hyppigst størrelse) for alle prøvene fra de ulike leverandørene varierte mellom 59-63 nm.

PerkinElmer NPene gav en TE på 5,7% når størrelsebestemmelsesgrensen ble satt som en nedre grense, noe som samsvarer med TE-verdien til valideringen for PerkinElmer på 5,5% (figur 4.1). Når størrelsebestemmelsesgrensen ble satt som et intervall ble TE for PerkinElmer høyere med en verdi på 6,1%, mens NanoComposix hadde en verdi på 6,9%.

Tabell 4.1 Partikkelantall, partikkelantallkonsentrasjon, massekonsentrasjon, totalkonsentrasjon og størrelse (gjennomsnitt, median og hyppigst størrelse) resultater gitt som gjennomsnitt og RSD(%) for PerkinElmer og NanoComposix Au 60 nm NP referansemateriale 100 ng/L. RSD=relativt standardavvik. Resultater fra tidligere validering av PerkinElmer NPene på HI er inkludert for sammenligning. Størrelsebestemmelsesgrensen er satt som en intervallgrense eller nedre grense.

Nanopartikler		Transport- effektivitet	Partikkel- antall	Partikkelantall- konsentrasjon (Partikler/L)	Masse- konsentrasjon (ng/L)	Total- konsentrasjon (ng/L)	Gjennomsnitts- størrelse (nm)	Median størrelse (nm)	Hyppigst størrelse (nm)
N	Parameter	(%)							
PerkinElmer	Snitt	5,5	813	$2,1 \cdot 10^7$	46	51	59	59	60
Au NPer validering	5 RSD%	5,5	10	8,9	8,9	7,6	0,6	0,5	0
nedre grense									
PerkinElmer	Snitt	5,7	811	$2,1 \cdot 10^7$	45	50	59	59	59
Au NPer	7 RSD%	4,7	6,3	8,3	8,3	9,1	0,1	0,5	1,6
nedre grense									
PerkinElmer	Snitt	6,1	749	$1,8 \cdot 10^7$	39	50	60	60	61
Au NPer	7 RSD%	5,1	7,1	10	10	9,1	0,04	0,1	1,6
intervallgrense									
NanoComposix	Snitt	6,9	1451	$3,0 \cdot 10^7$	66	75	60	60	63
Au NPer	8 RSD%	6,0	11	12	12	12	0,1	0,3	1,7
intervallgrense									

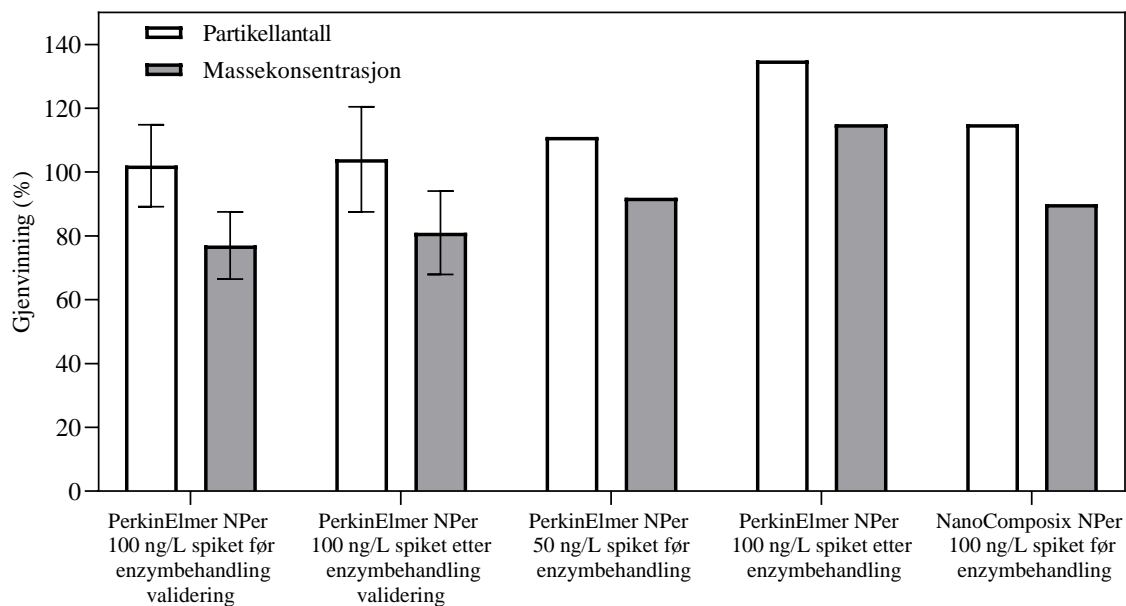


Figur 4.1 Transporteffektivitet (TE) (%) for 100 ng/L Au NPer 60 nm fra PerkinElmer og NanoComposix. Bestemmelsesgrense satt som nedre grense eller som intervall. Feilfelt gitt som måleusikkerhet (95% sikkerhet). Resultater fra tidligere validering av PerkinElmer NPene på HI er inkludert for sammenligning. Størrelsebestemmelsesgrensen er satt som en intervallgrense eller nedre grense.

Figur 4.2 og tabell 4.2 viser resultatene for Au NPer i spiket i blåskjell. Størrelsebestemmelsesgrensen ble satt som en nedre grense for alle prøvene med blåskjell. PerkinElmer NPer spiket i blåskjell før enzymbehandling gav en gjenvinning for massekonsentrasjonen og partikkelantallet på 92% og 111%, respektivt. Prøvene spiket etter enzymbehandling gav en gjenvinning for massekonsentrasjon og partikkelantallet på henholdsvis 115% og 135%. Valideringen utført tidligere av HI gav tilsvarende verdier for de spikete blåskjellprøvene spiket før og etter enzymbehandling, der gjenvinningen for massekonsentrasjonen varierte mellom 77-81% og partikkelantallet varierte mellom 102-104%. NanoComposix NPer spiket i blåskjell før enzymbehandlingen gav en gjenvinning for massekonsentrasjonen og partikkelantallet på 90% og 115%, respektivt. Totalkonsentrasjonen for PerkinElmer og NanoComposix NPene i blåskjell skilte seg fra valideringsresultatene med en gjenvinning på 115-237%. Dette kommer trolig fra bidraget av blåskjellmatriksen hvor blåskjellene i seg selv hadde en høy totalkonsentrasjon på 14-62 ng/L (vedlegg 3.2). Valideringen hadde en lavere totalkonsentrasjon gjenvinning på 99-104%. I alle de spikete blåskjellprøvene var størrelsesparameterne (hyppigst, median og gjennomsnitt) i nærheten av den teoretiske verdien, hvor gjenvinning varierte mellom 90-97%.

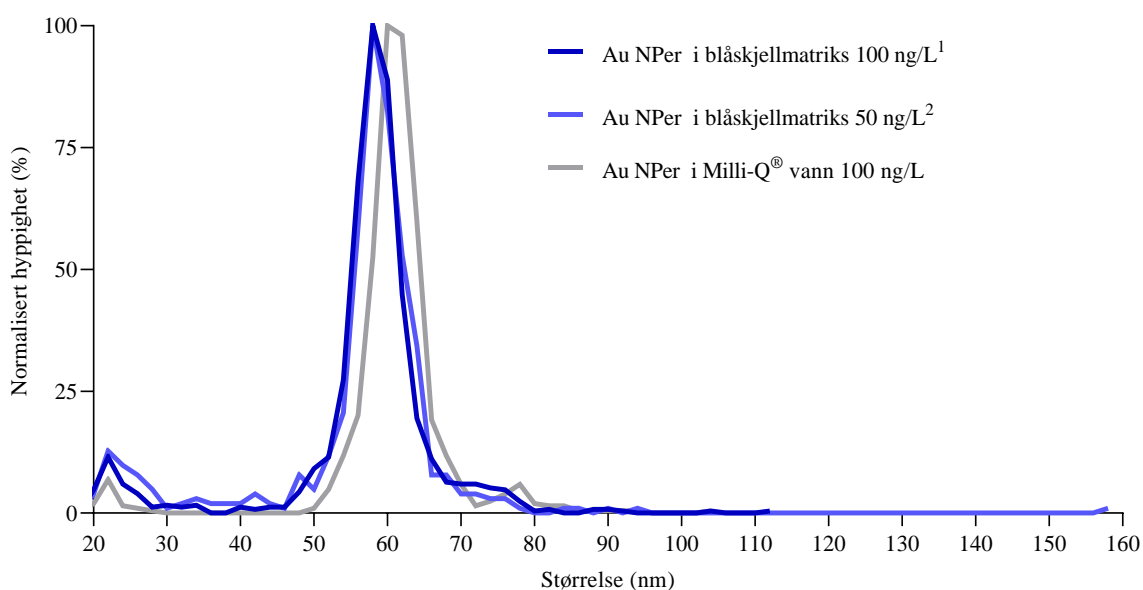
Tabell 4.2 Partikkelantall, partikkelantallkonsentrasjon, massekonsentrasjon, totalkonsentrasjon og størrelse (gjennomsnitt, median og hyppigst størrelse) resultater gitt som gjennomsnitt, RSD (%), teoretisk verdi og gjenvinning for PerkinElmer og NanoComposix Au 60 nm NPer i blåskjellmatriks spiket før og etter enzymbehandling. Gjenvinning er regnet fra teoretisk verdi, teoretisk verdi er målte resultater uten matriks. RSD=relativt standardavvik. Resultater fra tidligere validering av PerkinElmer NPene på HI er inkludert for sammenligning.

Nanopartikler			Partikkel-	Partikkelantall-	Masse-	Total-	Gj.snitt	Median	Hyppigst
Prøve	N	Parameter	antall	konsentrasjon	konsentrasjon	konsentrasjon	størrelse	størrelse	størrelse
			(Partikler/L)	(ng/L)	(ng/L)	(ng/L)	(nm)	(nm)	(nm)
Perkinelmer	50 ng/L spiket i matriks før enzymbehandling	Gjennomsnitt	472	$1,1 \cdot 10^7$	22	62	55	57	58
		Teoretisk verdi	427	$1,1 \cdot 10^7$	24	26	60	60	60
		Gjenvinning(%)	111	111	92	237	91	95	97
Au 60 nm NPer	100 ng/L spiket i matriks etter enzymbehandling	Gjennomsnitt	1148	$2,8 \cdot 10^7$	54	104	56	57	58
		Teoretisk verdi	853	$2,1 \cdot 10^7$	47	52	60	60	60
		Gjenvinning(%)	135	135	115	200	94	96	97
Perkinelmer	100 ng/L spiket i matriks før enzymbehandling	Gjennomsnitt	825	$2,2 \cdot 10^7$	35	52	53	53	54
		RSD(%)	8,9	6,2	8,5	23	0,8	0,9	1,2
		Teoretisk verdi	813	$2,1 \cdot 10^7$	46	51	59	59	60
		Gjenvinning(%)	102	102	77	104	90	91	90
Validering	100 ng/L spiket i matriks etter enzymbehandling	Gjennomsnitt	839	$2,2 \cdot 10^7$	37	50	54	54	55
		RSD(%)	9,5	10	10	24	1,0	0,4	2,0
		Teoretisk verdi	813	$2,1 \cdot 10^7$	46	51	59	59	60
		Gjenvinning(%)	104	104	81	99	91	92	91
NanoComposix	100 ng/L spiket i matriks før enzymbehandling	Gjennomsnitt	1620	$3,5 \cdot 10^7$	60	80	55	55	58
		Teoretisk verdi	1405	$3,0 \cdot 10^7$	67	70	59	60	64
		Gjenvinning(%)	115	115	90	115	92	92	91

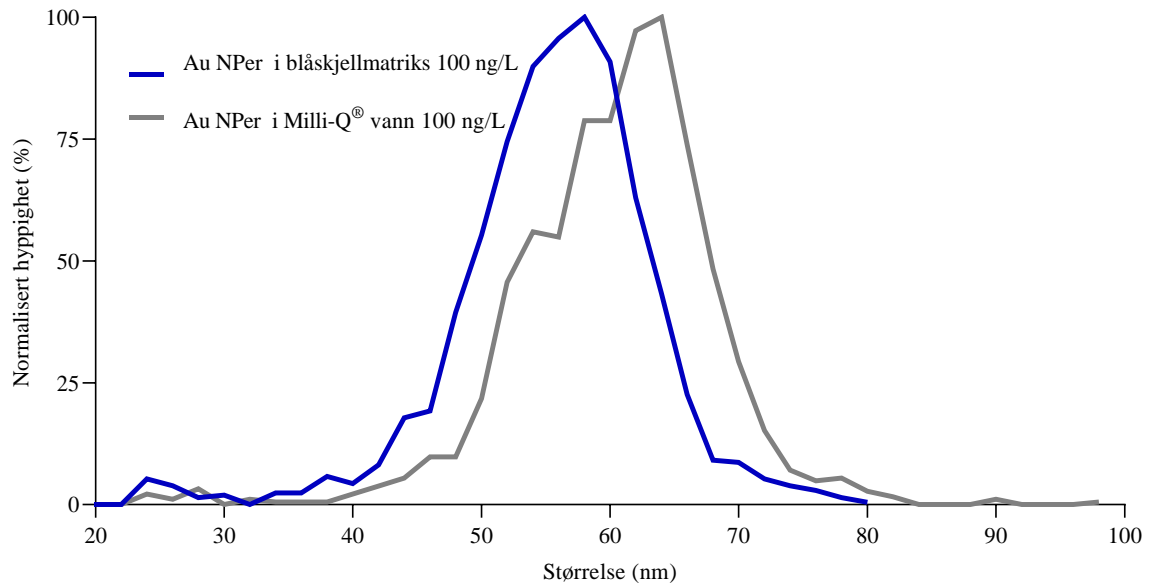


Figur 4.2 Partikkelantall og massekonsentrasjon gjenvinning (%) for PerkinElmer og NanoComposix Au 60 nm NPer i blåskjellmatriks spiket før og etter enzymbehandling. Gjenvinning regnet fra Au NP resultater uten matriks. Resultater fra tidligere validering av PerkinElmer NPene på HI er inkludert for sammenligning. Feilfelt gitt som standardavvik.

Størrelsesfordelingen til PerkinElmer (figur 4.3) og NanoComposix (figur 4.4) NPene viste en hovedfordistribusjon i nærheten av 60 nm. PerkinElmer NPene viste en smalere størrelsesfordeling enn NanoComposix. PerkinElmer NPene spiket i blåskjellmatriks før og etter enzymbehandling hadde tilsvarende størrelsesfordelinger. Både PerkinElmer og NanoComposix NPene i Milli-Q[®] vann skilte seg delvis fra NPene spiket i blåskjellmatriks.



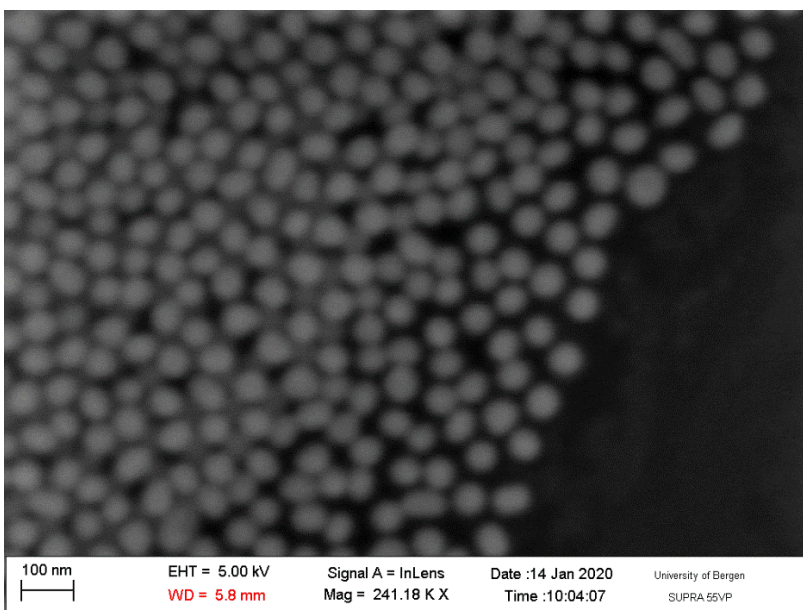
Figur 4.3 PerkinElmer Au NPer 60 nm 50-100 ng/L i Milli-Q[®] vann og spiket i blåskjellmatriks både før og etter enzymbehandling. ¹Spiket etter enzymbehandling, ²spiket før enzymbehandling.



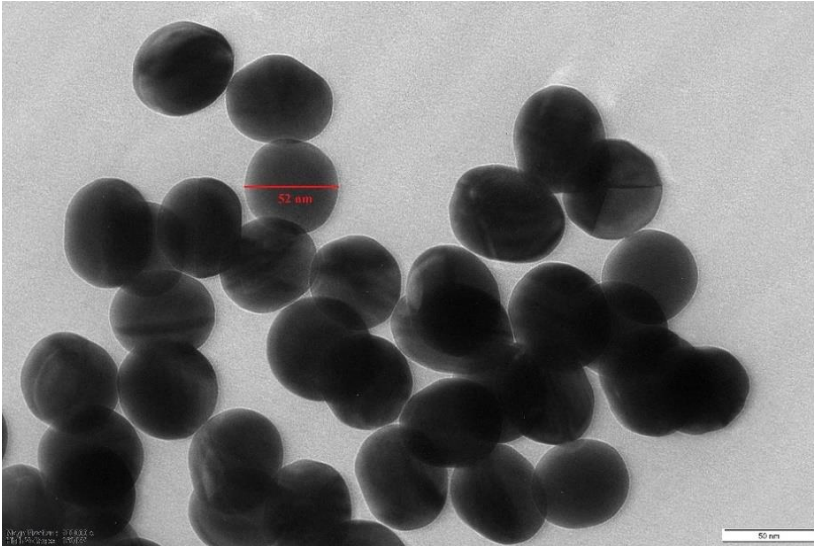
Figur 4.4 NanoComposix Au NPer 60 nm 100 ng/L i Milli-Q® vann og spiket i blåskjellmatriks før enzymbehandling.

4.1.2 Elektronmikroskopi (SEM og TEM)

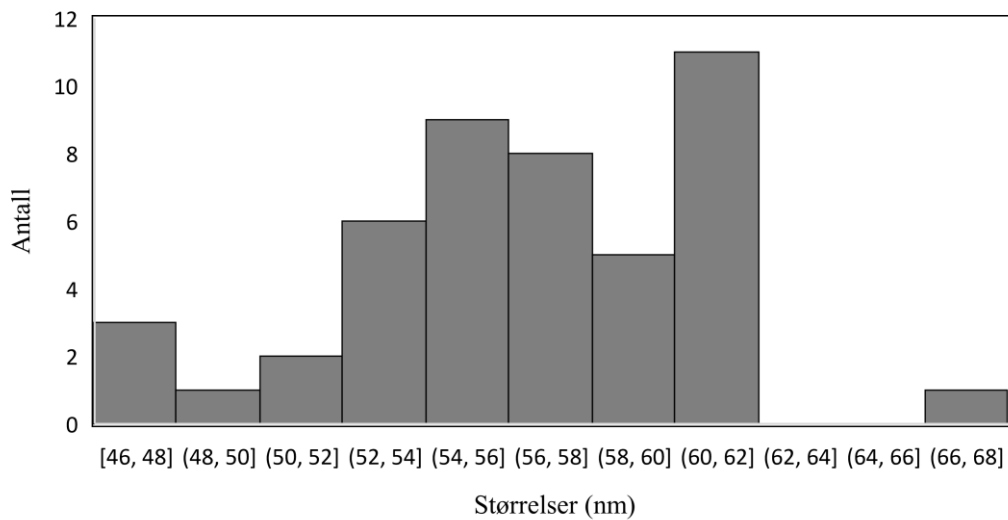
Fra SEM (figur 4.5) og TEM (figur 4.6) analysene av PerkinElmer NPene kom det fram at NPene var tilnærmet sfæriske og relativt monodispers, men enkelte NPer viste seg til å være litt mer avlang i formen. Størrelsen blant NPene varierte mellom 46-68 nm, hvor mesteparten av NPene var i størrelsesområdet 52-62 nm, imens gjennomsnittet var på 57 nm (figur 4.7).



Figur 4.5 Au NPer 60 nm 50 mg/L fra PerkinElmer analysert med SEM (ZEISS SUPRA 55VP)



Figur 4.6 Au NPer 60 nm 50 mg/L fra PerkinElmer analysert med TEM (JEOL 2100) (bilde tatt av stipendiat Are Sæle Bruvold fra HI)



Figur 4.7 histogram av størrelsesfordelingen til Au NPer 60 nm 50 mg/L fra PerkinElmer analysert med TEM, målt i Image J, $n=46$. Gjennomsnitt størrelse = 57 nm.

4.2 Sink(II)oksid <100 nm nanopartikler

4.2.1 sp-ICP-MS

Vist i tabell 4.3 er resultatene fra forsøkene med ZnO NPene. Tilnærmet ingen partikler ble målt for dispersjoner av ZnO NPene. Totalkonsentrasjonen til ZnO NP prøvene var noe høyere enn instrumentblankene, selv om forskjellen ikke var stor sammenlignet med blankene som hadde høyest bakgrunnsnivå. ZnO 100 ng/L NP prøvene hadde en totalkonsentrasjon på 180 ng/L imens vannblankene hadde et intervall på 44-173 ng/L. ZnO NP prøvene på 200 ng/L hadde bare én totalkonsentrasjon måling på 252 ng/L som skilte seg fra vannblankene. Med utgangspunkt i fullkvantsignalet fra Zn ionisk 10 µg/L vil man forvente et signal på ca. 1350 tellinger per sekund (CPS) for 100 ng/L ZnO NPer, noe som er innenfor vannblankene sitt intervall på 720-2863 CPS.

Tabell 4.3 Partikkelantall, totalkonsentrasjon og fullkvantsignal resultater for 100-200 ng/L ZnO NPer <100 nm, vannblanker og Zn ionisk 10 µg/L

Prøve	N	Parameter	Partikkel- antall	Total- konsentrasjon (ng/L)	Fullkvant- signal (CPS)
Zn ionisk 10 µg/L	1		-	-	1,7·10 ⁵
instrumentblank	3	Snitt	0	93	1540
		Maks-min	-	173-44	2863-720
ZnO NPer 100 ng/L	1		2	180	2977
ZnO NPer 200 ng/L	2	Snitt	0	211	3491
		Maks-min	-	252-171	4163-2820

4.3 Cerium(IV)oksid <50 nm og 30-50 nm nanopartikler

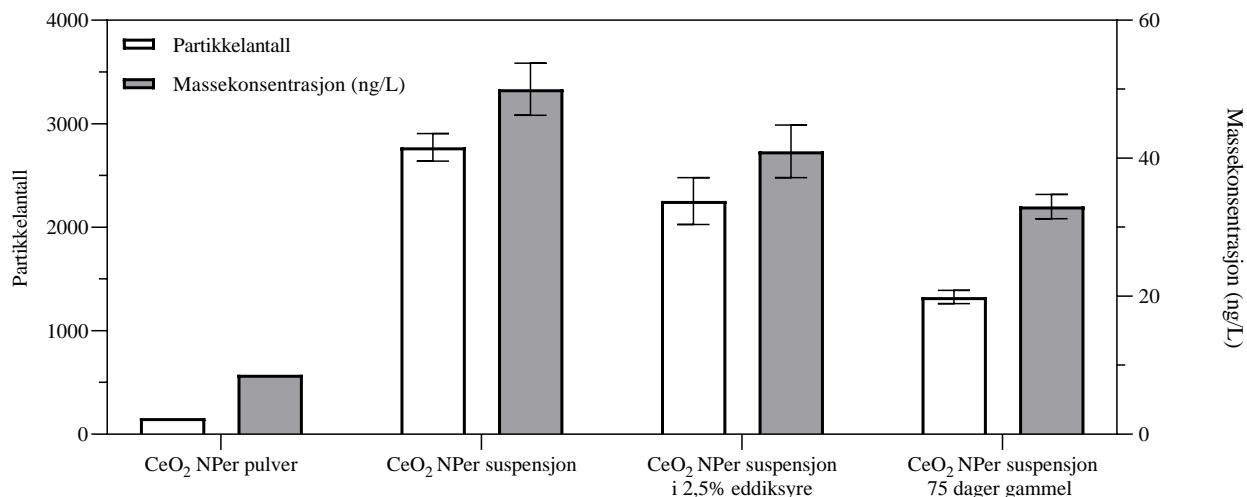
4.3.1 sp-ICP-MS

Tabell 4.4 og figur 4.8 viser resultatene for CeO NPene. CeO₂ NP-suspensjonene <50 nm på 100 ng/L lagd fra NP-pulver gav generelt lave verdier. Massekonsentrasjonen var på <10 ng/L og partikkelantallet var lavt med kun 157 partikler detektert. Størrelsesparameterne (gjennomsnitt, median og mest hyppigst) varierte mellom 28 – 60 nm og var dermed i nærheten av den nominelle størrelsen på <50 nm. Suspensjonen med 100 ng/L CeO₂ NPer 30-50 nm laget fra en ferdig leverandørsuspensjon viste bedre resultater med et partikkelantall, total- og massekonsentrasjon på henholdsvis 2772 partikler, 52 ng/L og 50 ng/L. Størrelsesområdet til NPene med et gjennomsnitt på 50 nm, median på 43 nm og mest hyppigst størrelse på 29 nm

samsvarte med leverandørens oppgitte gjennomsnittsstørrelse på 30-50 nm. Resultatene for NPene av 30-50 nm suspensjonen viste lite spredning med en RSD på <10% for alle parameterne. Resultatene ble ikke bedre når CeO₂ NP-suspensjonen på 30-50 nm ble fortynnet i 2,5% eddiksyre istedenfor Milli-Q[®] vann, og størrelsen til NPene forble tilnærmet uendret (figur 4.9). En mindre fersk stamsuspensjon (75 dager gammel) i Milli-Q[®] vann laget fra den ferdige CeO₂ 30-50 nm leverandørsuspensjonen gav lavere målte verdier med et partikkelantall, total- og massekonsentrasjon på henholdsvis 1326 partikler, 34 ng/L og 33 ng/L (tabell 4.4 og figur 4.8). NPene viste også en annen størrelsesfordeling med større NPer, med et gjennomsnitt på 56 nm, median på 50 nm og mest hyppigst størrelse på 42 nm (tabell 4.4 og figur 4.9)

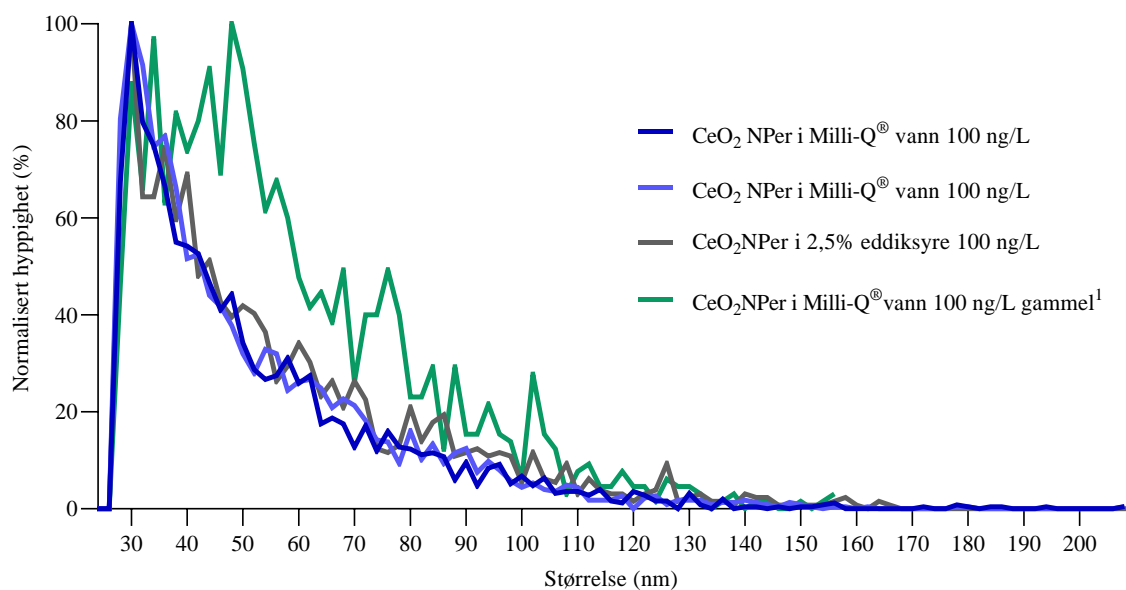
Tabell 4.4 Partikkelantall, partikkelantallkonsentrasjon, massekonsentrasjon, totalkonsentrasjon og størrelse (gjennomsnitt, median og hyppigst størrelse) resultater gitt som gjennomsnitt, minimum-maksimum og RSD (%) for CeO₂ NPer <50 nm fra pulverform og CeO₂ NPer 30-50 nm fra en ferdig leverandørsuspensjon. RSD=relativt standardavvik

Prøvetype	N	Parameter	Partikkel- antall	Partikkelantall- konsentrasjon (Partikler/L)	Masse- konsentrasjon (ng/L)	Total- konsentrasjon (ng/L)	Snitt størrelse (nm)	Median størrelse (nm)	Hyppigst størrelse (nm)
CeO ₂ NPer 100 ng/L pulver	2	Gjennomsnitt	157	3,2·10 ⁶	8,6	8,6	60	48	28
		Min-maks	138-176	2,8·10 ⁶ -3,6·10 ⁶	7-10	7-10	58-61	44-51	18-38
CeO ₂ NPer 100 ng/L suspensjon	5	Gjennomsnitt	2772	5,6·10 ⁷	50	52	50	43	29
		Min-maks	2576-2943	5,2·10 ⁷ -5,9·10 ⁷	44-53	45-56	49-52	42-44	28-30
		RSD (%)	4,8	4,5	7,6	8,4	2,1	2,1	3,8
CeO ₂ NPer 100 ng/L suspensjon 2,5% eddiksyre	2	Gjennomsnitt	2253	4,4·10 ⁷	41	43	49	40	25
		Min-maks	2099-2407	4,1·10 ⁷ -4,7·10 ⁷	40-41	43-43	48-49	39-40	24-26
CeO ₂ NPer 100 ng/L 75 dager gammel suspensjon	3	Gjennomsnitt	1326	3,0·10 ⁷	33	34	56	50	42
		Min-maks	1255-1381	2,8·10 ⁷ -3,1·10 ⁷	32-35	32-36	54-57	48-52	36-48
		RSD (%)	4,9	4,9	5,3	4,9	3,1	4,1	14



Figur 4.8 Partikkelantall og massekonsentrasjon for CeO₂ NPer <50 nm fra pulverform og CeO₂ NPer 30-50 nm fra en ferdig leverandørsuspensjon. Prøvene fra leverandørsuspensjonen ble fortynnet i Milli-Q[®] vann eller 2,5% eddiksyre. Feilfelt gitt som standardavvik.

Vist i figur 4.9 er størrelsesfordelingene til CeO₂ 30-50 nm NPene fra den ferdige leverandørsuspensjon. De ferske NP-prøvene i Milli-Q[®] vann viste størrelsesfordelinger som samsvarte med hverandre. Prøvene som var fortynnet i 2,5% eddiksyre i Milli-Q[®] vann hadde en tilsvarende fordeling som de ferske prøvene fortynnet i rent Milli-Q[®] vann. Prøvene fra den 75 dager gamle stamsuspensjonen skilte seg fra de andre prøvene, hvor fordelingen var forskjøvet mot større størrelser. I prøver uten blåskjellmatriks varierte størrelsen for NPene mellom 22-218 nm (data ikke vist).



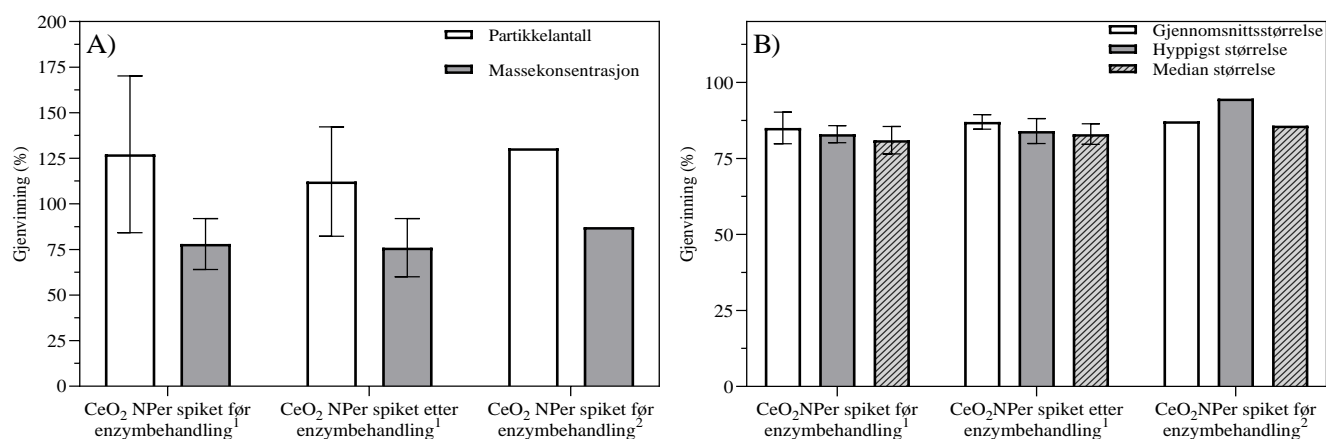
Figur 4.9 Normalisert hyppighet (%) av partikkelstørrelsene til CeO_2 NPer 30-50 nm 100 ng/L i Milli-Q[®] vann og 2,5% eddiksyre. ¹Mindre fersk suspensjon (75 dager gammel).

Tabell 4.5 viser resultatene for CeO_2 NPer i blåskjellmatriks spiket enten før eller etter enzymbehandling. Figur 4.10 viser de spikete blåskjellprøvene sin gjenvinning. Prøvene med blåskjellmatriks spiket med NPer viser et høyere partikkelantall enn de uten matriks med en gjenvinning på 112-130%. Sammenlignet mot prøvene uten matriks viste prøvene med blåskjellmatriks generelt en lavere massekonsentrasjon med en gjenvinning på 76-87% og en høyere totalkonsentrasjon på 295-420%. Den høye totalkonsentrasjonen kommer trolig av bidraget fra blåskjellene, blåskjellene hadde en totalkonsentrasjon på 87-167 ng/L (vedlegg 3.6). For alle blåskjellprøvene spiket med NPer var størrelsesparameterne mindre enn for prøvene uten matriks hvor gjenvinnvinning var 81-95%. NPene spiket etter og før enzymbehandling viste tilsvarende verdier over de fleste parameterne (tabell 4.5 og figur 4.10) og størrelsesfordelingene samsvarte med hverandre også (figur 4.11). Størrelsesfordelingen til NPene i blåskjell viste en fordeling som var forskjøvet mot mindre størrelser sammenlignet mot NPene uten matriks (figur 4.11).

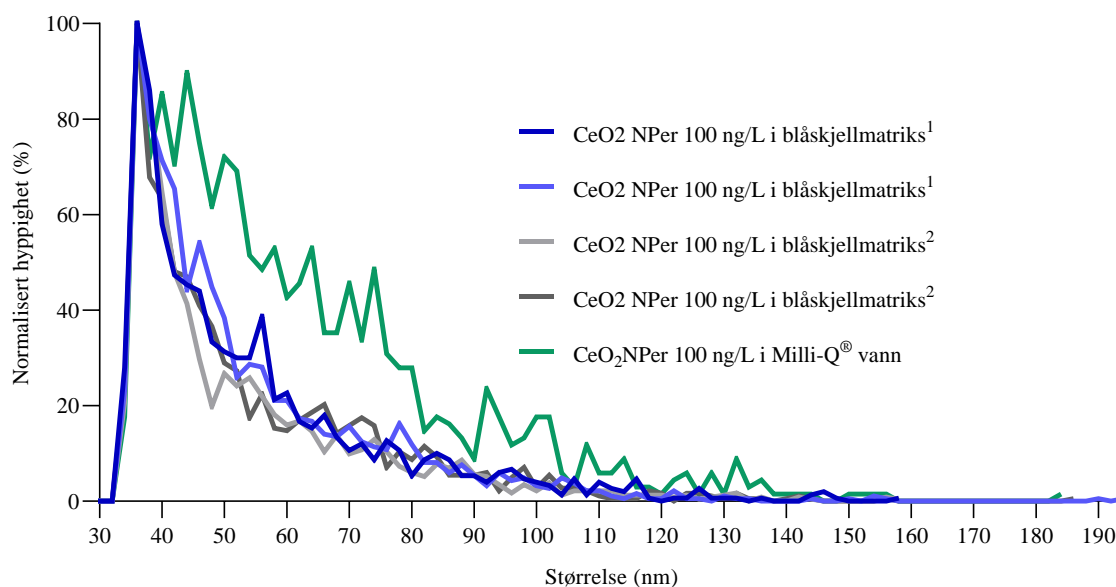
Tabell 4.5 Partikkelantall, partikkelantallkonsentrasjon, massekonsentrasjon, totalkonsentrasjon og størrelse (gjennomsnitt, median og hyppigst størrelse) resultater i form av gjennomsnitt, minimum-maksimum, RSD (%) og gjenvinning (%) for CeO₂ NPer 30-50 nm 100 ng/L spiket i blåskjellmatriks før og etter enzymbehandling. RSD=relativt standardavvik. Gjenvinning regnet mot teoretisk verdi, teoretisk verdi er målte 100 ng/L CeO₂ NP resultater uten matriks.

Prøvetype	N	Parameter	Partikkel- antall	Partikkelantall- konsentrasjon (Partikler/L)	Masse- konsentrasjon (ng/L)	Total- konsentrasjon (ng/L)	Snitt størrelse (nm)	Median størrelse (nm)	Hyppigst størrelse (nm)
CeO ₂ NPer i blåskjell		Gjennomsnitt	1891	3,71·10 ⁷	34	150	53	46	36
spiket før enzym- behandling ¹	2	Min-maks	1805-1976	3,5·10 ⁷ -3,9·10 ⁷	31-38	139-161	53-53	46-46	36-36
		Teoretisk verdi	1449	2,8·10 ⁷	39	51	61	53	38
		Gjenvinning (%)	130	130	87	295	87	86	95
CeO ₂ NPer i blåskjell spiket før enzym- behandling	6	Gjennomsnitt	1346	3,0·10 ⁷	25	140	53	45	36
		Min-maks	799-2017	1,8·10 ⁷ -4,5·10 ⁷	19-30	120-158	46-56	41-47	36-36
		RSD (%)	34	34	18	11	6,1	5,3	0
		Teoretisk verdi	1058	2,4·10 ⁷	33	34	62	56	43
CeO ₂ NPer i blåskjell spiket etter enzym- behandling	6	Gjennomsnitt	1189	2,7·10 ⁷	25	142	54	46	36
		Min-maks	850-1699	1,9·10 ⁷ -3,8·10 ⁷	19-32	112-187	52-56	44-49	36-38
		RSD (%)	28	27	21	19	2,8	4,1	2,2
		Teoretisk verdi	1058	2,4·10 ⁷	33	34	62	56	43
CeO ₂ NPer i blåskjell spiket etter enzym- behandling	6	Gjennomsnitt	112	111	76	420	87	83	84
		Gjenvinning (%)	112	111	76	420	87	83	84

¹NPer fortennet i 2,5% eddiksyre før spiking



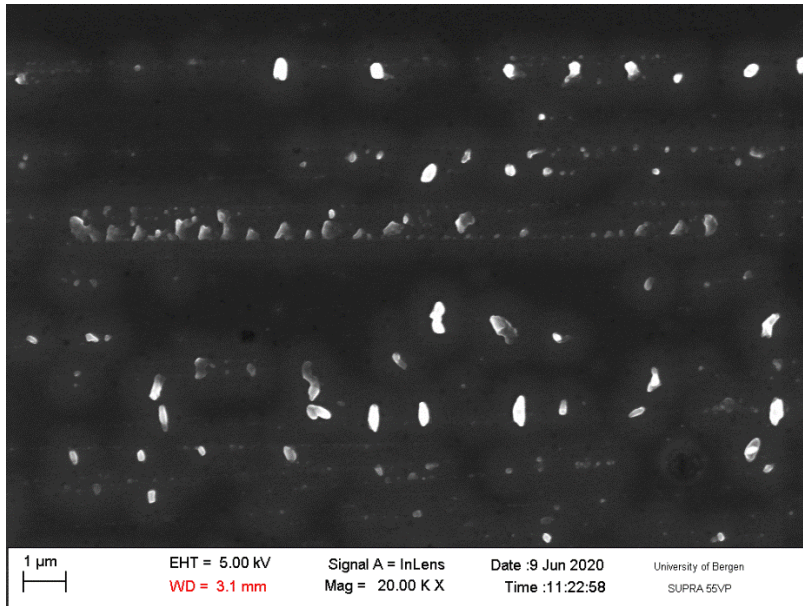
Figur 4.10 Partikkelantall og massekonsentrasjon (A), og gjennomsnitt, median og mest hyppigste størrelse (B) gjenvinningsverdier (%) for 100 ng/L CeO₂ 30-50 nm NPer i blåskjellmatriks spiket før og etter enzymbehandling. ¹Inneholder 100 ng/L ZrO₂ NPer også, ²NPer fortennet i 2,5% eddiksyre før spiking. Gjenvinning regnet mot målte 100 ng/L CeO₂ NP resultater uten matriks. Feilfelt gitt som standardavvik.



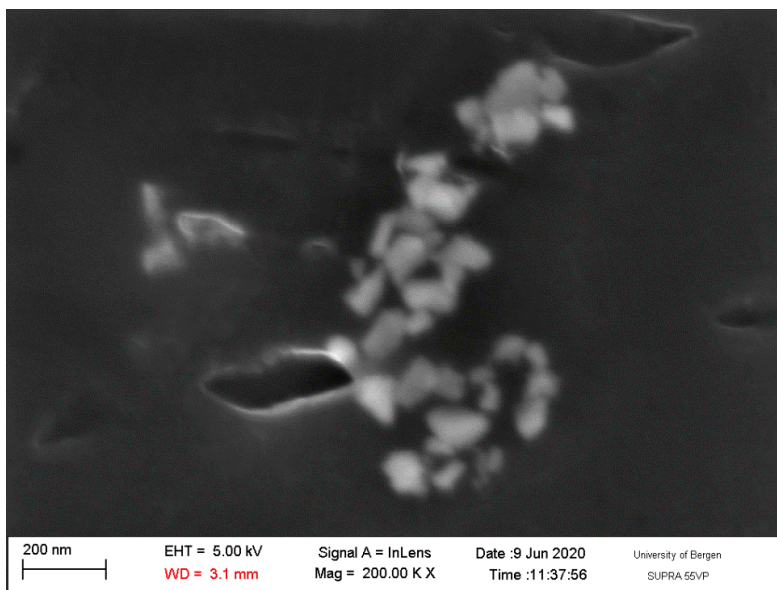
Figur 4.11 Normalisert hyppighet (%) av partikkelstørrelsene til CeO_2 NPer 30-50 nm 100 ng/L i Milli-Q[®] vann og blåskjellmatris. ¹Spiket før enzymbehandling. ²Spiket etter enzymbehandling.

4.3.2 Elektronmikroskopi (SEM)

SEM bildene (figur 4.12 og vedlegg 4.1) av CeO_2 <50 nm NP suspensjonen lagd fra pulverform viste variasjoner i form og størrelse til NPene. Enkelte NPer var <100 nm, mens mange var over flere hundre nanometer, enkelte partikler var også større enn 1 μm . Imidlertid var kvaliteten på bildet til CeO_2 <50 nm NPene ganske dårlig grunnet ukjente instrumentelle årsaker. Dette gjør det vanskelig å påpeke hva som faktisk er partikler på bildet. For CeO_2 NPene med nominell størrelse 30-50 nm fortynnet fra en ferdig leverandørsuspensjon var mange av NPene <100 nm (figur 4.13). Et fåtall ble funnet i intervallet på ca. 100-150 nm. Formen til disse NPene var også varierende.



figur 4.12 CeO₂ NPer <50 nm 50 mg/L laget fra NP-pulver analysert med SEM (ZEISS SUPRA 55VP)



figur 4.13 CeO₂ NPer 30-50 nm 50 mg/L fortynnet fra leverandørsuspensjon analysert med SEM (ZEISS SUPRA 55VP)

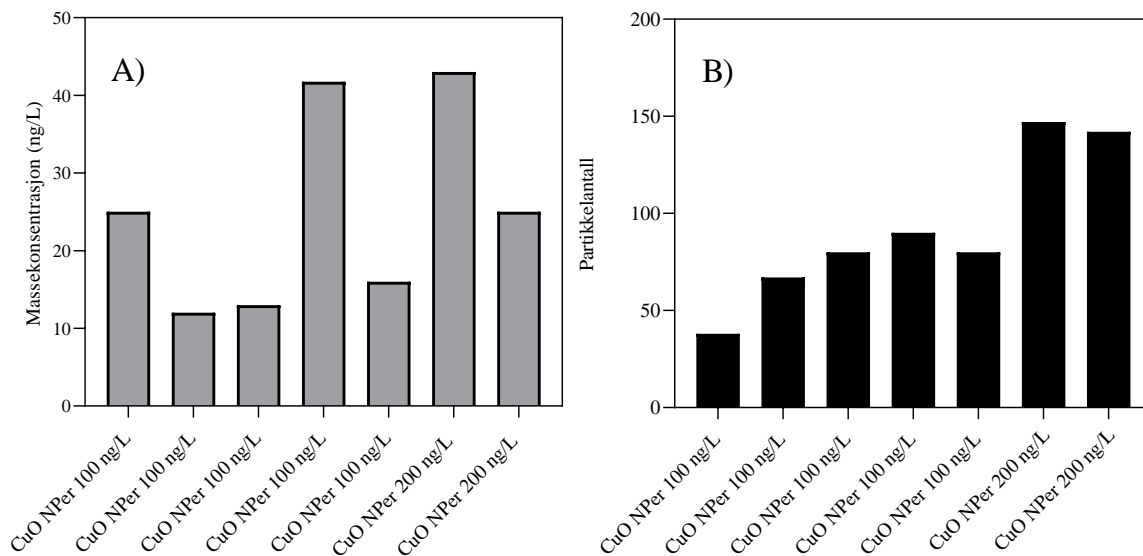
4.4 Kobber(II)oksid <50 nm nanopartikler

4.4.1 sp-ICP-MS

Tabell 4.6 og figur 4.14 viser resultatene fra CuO NPene med en nominell størrelse på <50 nm. Resultatene viste et lavt partikkelantall for CuO NPene. Det ble funnet 74, 145 og 400 partikler i prøvene ved konsentrasjoner på henholdsvis 100, 200 og 500 ng/L. Målingene for massekonsentrasjonen var også lav med en verdi på 22, 34 og 108 ng/L for prøvene på henholdsvis 100, 200 og 500 ng/L. Totalkonsentrasjonen viste høyere verdier enn massekonsentrasjonen, noe som trolig henger sammen med den høye totalkonsentrasjonen i blankprøver med en gjennomsnittsverdi på 60 ng/L (vedlegg 3.11). Gjennomsnitt- og medianstørrelsen for alle prøvene på 88-110 nm, var langt fra den oppgitte størrelsen på <50 nm. Den mest hyppigste størrelsen var nærmere den oppgitte størrelsen på <50 nm med verdier på mellom 36 – 66 nm. Massekonsentrasjonen viste en høy variasjon mellom prøvene (figur 4.14), hvor RSD verdien var på 57% for 100 ng/L prøvene (tabell 4.6). Partikkelantallet viste en mindre variasjon enn massekonsentrasjonen, hvor 100 ng/L prøvene hadde en RSD på 28%.

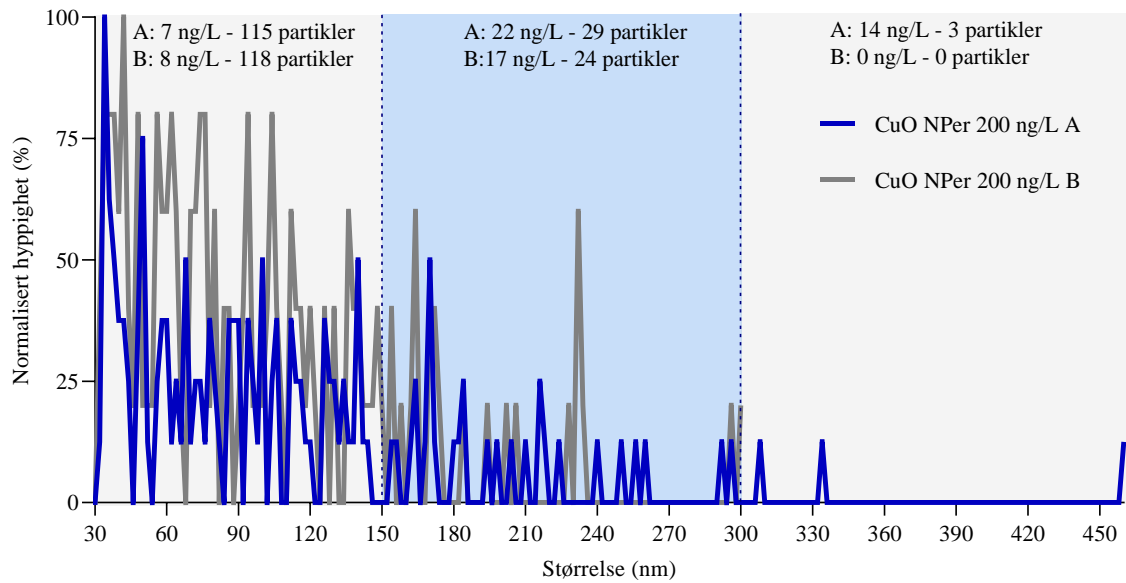
Tabell 4.6 Partikkelantall, partikkelantallkonsentrasjon, massekonsentrasjon, totalkonsentrasjon og størrelse (gjennomsnitt, median og hyppigst størrelse) resultater gitt som gjennomsnitt, minimum-maksimum og RSD (%) for CuO NPer <50 nm 100 – 500 ng/L. RSD=relativt standardavvik

Prøvetype	N	Parameter	Partikkel- antall	Partikkelantall- konsentrasjon (Partikler/L)	Masse- konsentrasjon (ng/L)	total- konsentrasjon (ng/L)	Snitt størrelse (nm)	Median størrelse (nm)	Hyppigst størrelse (nm)
CuO NPer 100 ng/L	4	Gjennomsnitt	71	$1,7 \cdot 10^6$	22	66,3	111	95	66
		Min-maks	38-90	$8,9 \cdot 10^5$ - $2,3 \cdot 10^6$	12-42	45-109	93-154	78-133	34-120
		RSD (%)	28	32	57	41	22	24	64
CuO NPer 200 ng/L	2	Gjennomsnitt	145	$3,7 \cdot 10^6$	34	79,1	103	88	38
		Min-maks	142-147	$3,6 \cdot 10^6$ - $3,7 \cdot 10^6$	25-43	66-92	98-108	85-92	34-42
		Gjennomsnitt	400	$1,0 \cdot 10^7$	108	148,3	110	97	36
CuO NPer 500 ng/L	2	Min-maks	374-425	$9,5 \cdot 10^6$ - $1,1 \cdot 10^7$	92-124	133-164	109-112	97-97	36-36

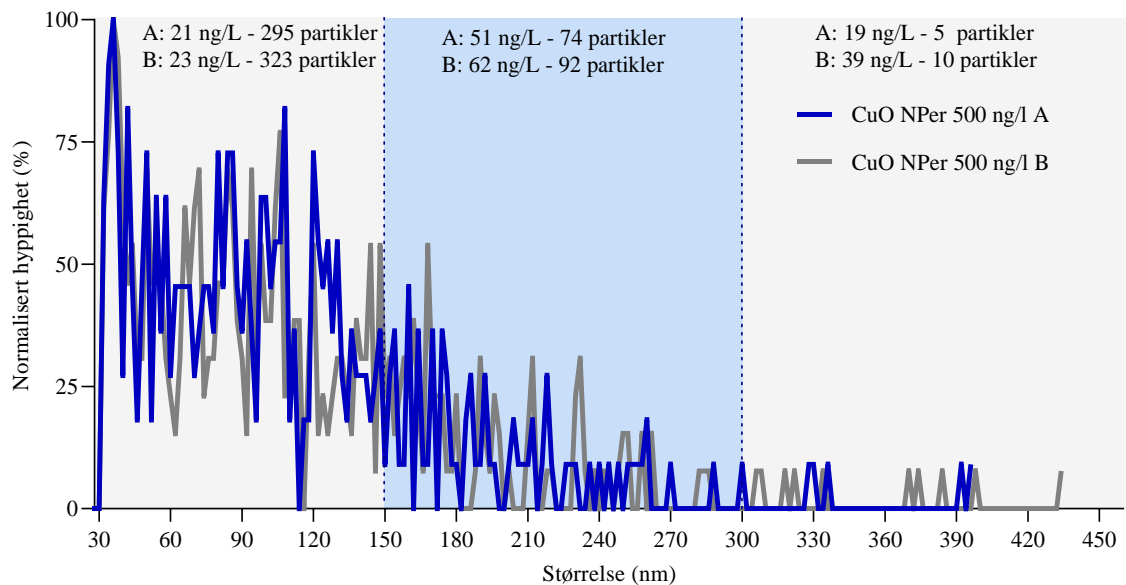


Figur 4.14 massekonsentrasjonen (A) og partikkelantallet (B) til CuO NPer <50 nm paralleller i Milli-Q® vann 100-200 ng/L

Figur 4.15 og 4.16 viser størrelsesfordelingen, massekonsentrasjonen og partikkelantallet innenfor størrelsesområdene på 30-150 nm, 150-300 nm og >300 nm til noen CuO NP-paralleller. NPer med størrelse mellom 30-582 nm ble detektert (data ikke vist), hvor den største andelen av NPene hadde en størrelse mellom 30-250 nm. NPene på over 150 nm utgjorde den største andelen av massekonsentrasjonen til prøvene. NPene på over 300 nm utgjorde en liten andel av det totale partikkelantallet, men utgjorde ofte en stor andel av den totale massekonsentrasjonen. F.eks. hos parallell-A utgjorde tre NPer på over 300 nm 14 ng/L av den totale massekonsentrasjonen på 43 ng/L. Det var også varierende hvor mange NPer parallellene hadde som var over 300 nm. For 200 ng/L prøvene hadde parallell-A 3 NPer over 300 nm, imens B hadde ingen. For 500 ng/L parallellene hadde parallell-A 5 NPer imens parallell-B hadde 10.



Figur 4.15 Normalisert hyppighet (%) av partikkelstørrelsene for CuO NPer <50 nm i Milli-Q® vann 200 ng/L (parallell A og B), samt partikkelantallet og massekonsentrasjonen til parallellene i størrelsesområdene: 30-150 nm, 150-300 nm og over 300 nm.



Figur 4.16 Normalisert hyppighet (%) av partikkelstørrelsene for CuO NPer <50 nm i Milli-Q® vann 500 ng/L (parallell A og B), samt partikkelantallet og massekonsentrasjonen til parallellene i størrelsesområdene: 30-150 nm, 150-300 nm og over 300 nm.

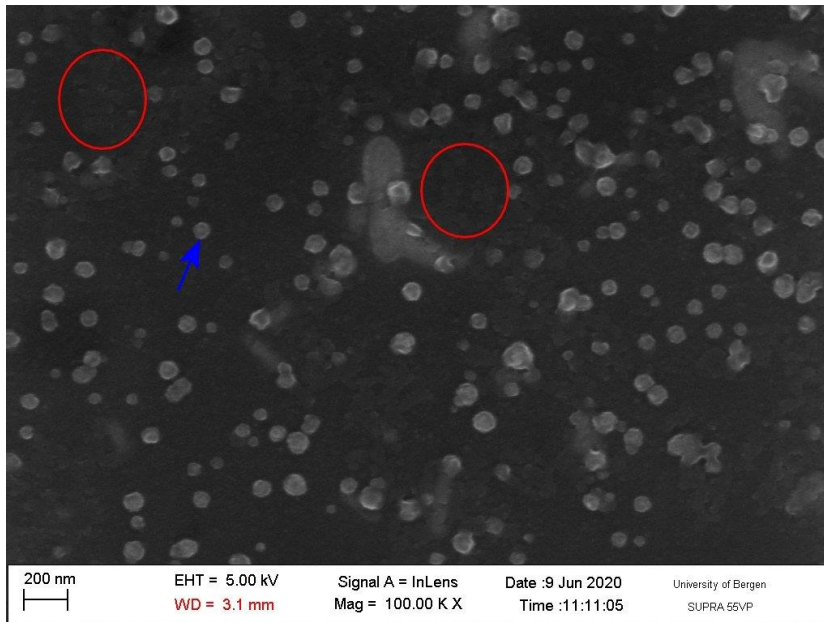
Tabell 4.7 viser resultatene for CuO NPene stabilisert med 0,1% sitronsyre, natriumsitrat, PVP-10 og PVP-40. For de stabiliserte prøvene med 100 ng/L og 1 µg/L CuO NPer gav prøvene med natriumsitrat høyest målinger, fulgt av henholdsvis PVP-40, PVP-10 og sitronsyre. Sett bort ifra partikkelantallet til 100 ng/L CuO NP-prøven med natriumsitrat var alle resultatene for de stabiliserte prøvene under eller innenfor maks-minimum intervallet til de ustabiliserte prøvene (tabell 4.6). Prøvene med sitronsyre gav lavest målinger av alle CuO NP-prøvene (både de stabiliserte og ustabiliserte), hvor 100 ng/L prøven med sitronsyre hadde en massekonsentrasjon på 3 ng/L og partikkelantall på 26.

Tabell 4.7 Partikkelantall, partikkelantallkonsentrasjon, massekonsentrasjon, totalkonsentrasjon og størrelse (gjennomsnitt, median og hyppigst størrelse) resultater for CuO NPer <50 nm 100 ng/L – 1 µg/L stabilisert med 0,1% sitronsyre, natriumsitrat, PVP-10 og PVP-40.

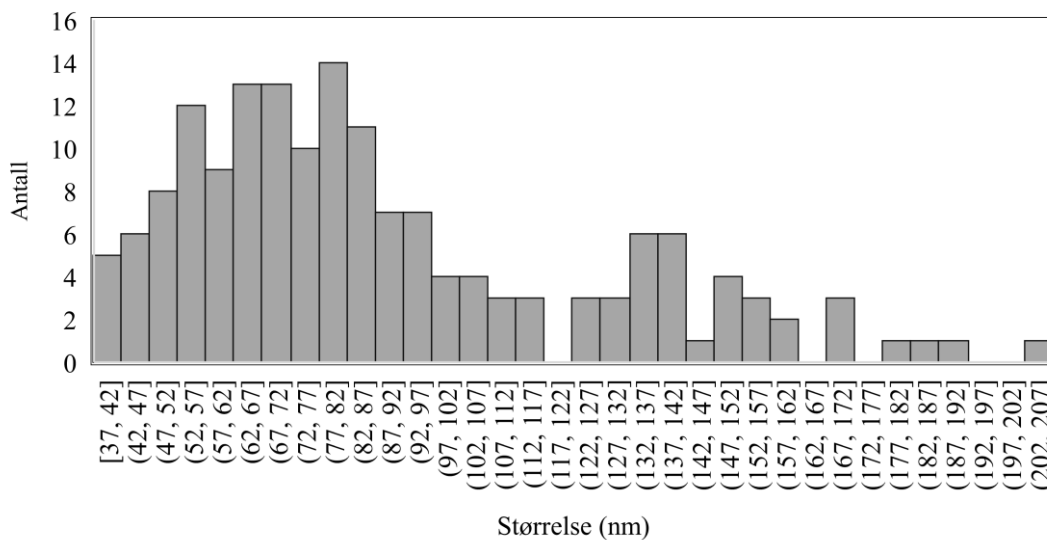
Prøvetype	Partikkel- antall	Partikkelantall- konsentrasjon (Partikler/L)	Masse- konsentrasjon (ng/L)	Total- konsentrasjon (ng/L)	Snitt størrelse (nm)	Median størrelse (nm)	Hyppigst størrelse (nm)
CuO NPer 0,1% sitronsyre 100 ng/L	26	$6,1 \cdot 10^5$	3,0	73	95	97	114
CuO NPer 0,1% natriumsitrat 100 ng/L	108	$2,5 \cdot 10^6$	25	69	102	84	38
CuO NPer 0,1% PVP-10.000 100 ng/L	45	$1,1 \cdot 10^6$	13	53	117	107	40
CuO NPer 0,1% PVP-40.000 100 ng/L	61	$1,4 \cdot 10^6$	17	59	109	83	36
CuO NPer 0,1% sitronsyre 1 µg/L	306	$7,2 \cdot 10^6$	46	460	108	91	80
CuO NPer 0,1% natriumsitrat 1 µg/L	775	$1,8 \cdot 10^7$	201	300	114	100	88
CuO NPer 0,1% PVP-10.000 1 µg/L	318	$7,4 \cdot 10^6$	133	188	130	115	40
CuO NPer 0,1% PVP-40.000 1 µg/L	235	$5,5 \cdot 10^6$	92	166	133	117	80

4.4.2 Elektronmikroskopi (SEM)

Med SEM ble det observert CuO NPer av tilnærmet sfærisk form med varierende størrelser (figur 4.17). NPer som kom tydelig fram på bildet (blå pil figur 4.17) hadde en størrelse på ca. 40 – 210 nm (figur 4.18). Det var også antydninger til NPer av mindre størrelser (<35 nm) i bakgrunnen (Markert i røde sirkler i figur 4.17). Disse ble ikke målt ettersom at de ikke kom tydelig nok fram på bildet.



figur 4.17 CuO NPer <50 nm i Milli-Q[®] vann 50 mg/L analysert med SEM (ZEISS SUPRA 55VP)



Figur 4.18 histogram av størrelsesfordelingen til sfæriske CuO NPer (blå pil figur 4.12) <50 nm i Milli-Q[®] vann 50 mg/L analysert med SEM, målt i Image J, n=46

4.5 Zirkonium(IV) oksid nanopartikler <100 nm

4.5.1 sp-ICP-MS

Tabell 4.8 og figur 4.19 viser resultatene for ZrO₂ NPene både med og uten natriumsitrat som stabilisator. Prøvene ble stabilisert med natriumsitrat på tre ulike måter: noen prøver ble stabilisert bare ved å lage stamsuspensjonen i 0,1% natriumsitrat og ble deretter videre fortynnet i Milli-Q[®] vann fram til analyse, det samme ble gjort med en annen prøvevariant bortsett fra at det ble benyttet en stamsuspensjon med 0,5% natriumsitrat, den siste varianten ble stabilisert ved stamsuspensjonen med 0,1% natriumsitrat og ble videre fortynnet i 0,1% natriumsitrat fram til analyse. Prøvene som ble stabilisert ved stamsuspensjonen med 0,1% natriumsitrat og ble videre fortynnet med 0,1% natriumsitrat fram til analyse gav høyest målinger med et partikkelantall, massekonsentrasjon og totalkonsentrasjon på henholdsvis 1122 partikler, 70 ng/L og 181 ng/L. Prøvene som bare ble stabilisert ved stamsuspensjonen med 0,1 og 0,5% natriumsitrat gav tilsvarende resultater til hverandre med et partikkelantall på 627-775 partikler, massekonsentrasjon på 40-44 ng/L og totalkonsentrasjon på 42-45 ng/L. Av alle prøvetypene gav de ustabiliserte prøvene lavest målinger med et partikkelantall på 224 partikler, massekonsentrasjon 34 ng/L og totalkonsentrasjon på 35 ng/L. Partikkelantallet til de ustabiliserte prøvene skilte seg fra prøvene bare stabilisert ved stamsuspensjonen med 0,1% og 0,5% natriumsitrat. Imidlertid skilte ikke massekonsentrasjonen for de ustabiliserte prøvene seg like mye fra prøvene bare stabilisert ved stamsuspensjonen med 0,1% og 0,5% natriumsitrat, ettersom feilfeltene overlappet mye. Størrelsesparameterne (gjennomsnitt, median og mest hyppigst) varierte mellom 44-95 nm for de stabiliserte og ustabiliserte prøvene. De stabiliserte prøvene hadde mellom 8-20 nm mindre størrelse enn de ustabiliserte. For de ulike prøvene uten blåskjellmatriks ble NP-størrelser mellom 30-480 nm detektert (data ikke vist).

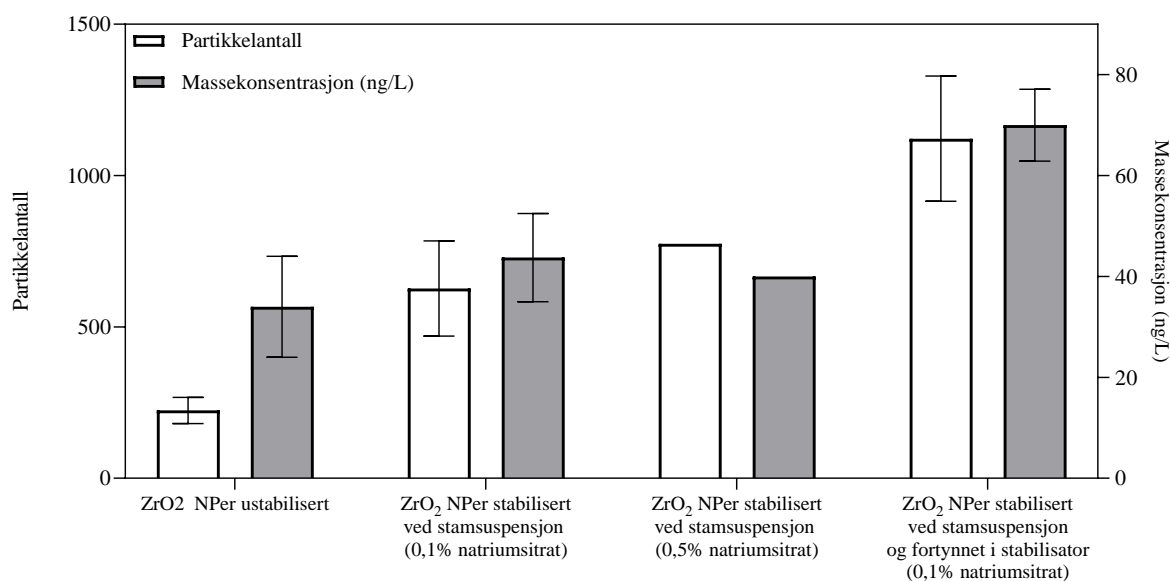
Tabell 4.8 Partikkelantall, partikkelantallkonsentrasjon, massekonsentrasjon, totalkonsentrasjon og størrelse (snitt, median og hyppigst størrelse) resultater gitt som gjennomsnitt, minimum-maksimum og RSD (%) for ZrO₂ NPer <100nm 100 ng/L ustabilisert og stabilisert med 0,1 - 0,5% natriumsitrat. RSD=relativt standardavvik

Prøvetype	N	Parameter	Partikkel- antall	Partikkelantall- konsentrasjon (Partikler/L)	Masse- konsentrasjon (ng/L)	Total- konsentrasjon (ng/L)	Snitt størrelse (nm)	Median størrelse (nm)	Hyppigst størrelse (nm)
ZrO ₂ NPer ustabilisert	6	Gjennomsnitt	224	4,5·10 ⁶	34	35	95	78	55
		Min-maks	168-275	3,2·10 ⁶ -5,6·10 ⁶	22-44	22-45	87-105	66-89	28-110
		RSD%	19	21	29	28	6,9	11	69
ZrO ₂ NPer stabilisert 0,1% natriumsitrat ¹	7	Gjennomsnitt	627	1,3·10 ⁷	44	45	82	70	44
		Min-maks	446-865	8,5·10 ⁶ -1,8·10 ⁷	31-55	32-55	71-96	61-79	34-52
		RSD%	25	30	20	20	12	11	13
ZrO ₂ NPer stabilisert 0,5% natriumsitrat ²	1		775	1,6·10 ⁷	40	42	75	65	46
ZrO NPer stabilisert 0,1% natriumsitrat ³	6	Gjennomsnitt	1122	2,4·10 ⁷	70	181	81	70	47
		Min-maks	932-1420	1,8·10 ⁷ -3,2·10 ⁷	57-77	123-268	75-88	65-75	44-50
		RSD%	18	27	10	35	6,7	5,7	4,4

¹Stabilisert med 0,1% natriumsitrat ved stamsuspensjonen og fortynnet i Milli-Q® vann fram til endelig 100 ng/L suspensjon.

²Stabilisert med 0,5% natriumsitrat ved stamsuspensjonen og fortynnet i Milli-Q® vann fram til endelig 100 ng/L suspensjon.

³Stabilisert med 0,1% natriumsitrat ved stamsuspensjon og fortynnet i 0,1% natriumsitrat fram til endelig 100 ng/L suspensjon.



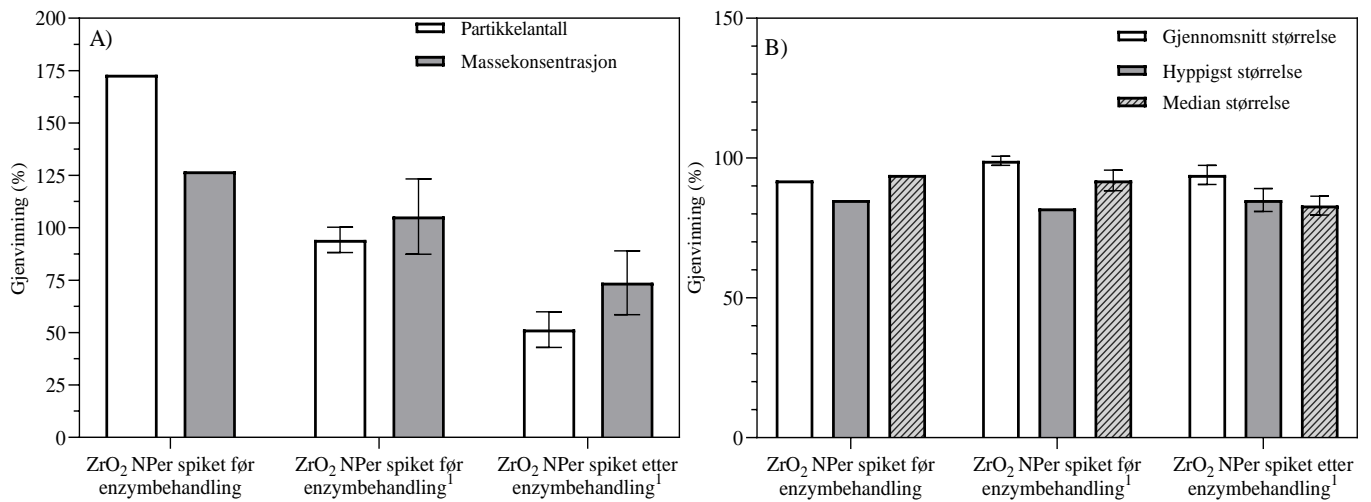
Figur 4.19 Partikkelantall og massekonsentrasjon for ZrO₂ <100 nm NPer 100 ng/L i Milli-Q® vann, stabilisert med 0,1 -0,5% natriumsitrat bare ved stamsuspensjonen og stabilisert med 0,1% natriumsitrat ved stamsuspensjonen og fortynnet i 0,1% natriumsitrat fram til endelig 100 ng/L suspensjon. Feilfelt gitt som standardavvik.

Tabell 4.9 og figur 4.20 viser resultatene for ZrO₂ NPer spiket i blåskjellmatriks både med og uten CeO₂ NPer tilsatt. Prøvene med bare ZrO₂ NPer spiket før enzymbehandling hadde en gjenvinning for partikkelantallet, massekonsentrasjonen og totalkonsentrasjonen på henholdsvis 173%, 127% og 315%. ZrO₂ NPene spiket før enzymbehandling i blåskjell sammen med CeO₂ NPer hadde gjenvinning for ZrO₂ på 94%, 105% og 129% for partikkelantallet, massekonsentrasjonen og totalkonsentrasjonen, respektivt. Prøvene spiket med CeO₂ og ZrO₂ etter enzymbehandling hadde en lavere gjenvinning for ZrO₂ NPene, NPene gav en gjenvinning for partikkelantallet, massekonsentrasjonen og totalkonsentrasjonen på henholdsvis 51%, 74% og 113%. Gjenvinningen til størrelsesparameterne varierte mellom 82-99% for alle prøvene. Blåskjellprøvene med bare ZrO₂ NPer hadde en tilsvarende størrelsesfordeling til ZrO₂ NP-prøvene uten matriks (figur 4.21). ZrO₂ NPene spiket i blåskjellprøver som også inneholdt CeO₂ NPer hadde en lik størrelsesfordeling uavhengig om de ble spiket før eller etter enzymbehandling, men prøvene skilte seg fra prøver i Milli-Q[®] vann (figur 4.22). I vedlegg 3.8 er det vist resultater for ZrO₂ NPer spiket i blåskjell sammen med CeO₂ NPer. Resultatene viste at spikete blåskjellprøver knapt kunne skilles fra uspikete blåskjellprøver, men resultatene er ikke diskutert videre her ettersom det ble mistenkt feil i prøveopparbeidingen.

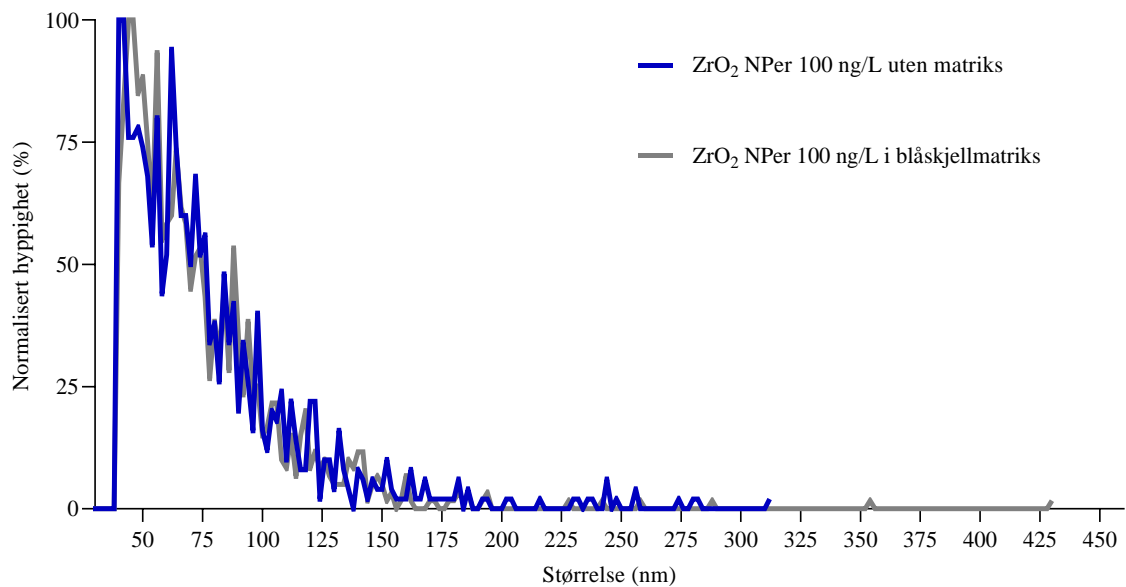
Tabell 4.9 Partikkelantall, partikkelantallkonsentrasjon, massekonsentrasjon, totalkonsentrasjon og størrelse (gjennomsnitt, median og hyppigst størrelse) resultater i form av gjennomsnitt, minimum-maksimum, RSD (%) og gjenvinning (%) for 0,1% natriumsitrat stabiliserte ZrO₂ NPer <100 nm 100 ng/L spiket i blåskjellmatriks før og etter enzymbehandling. RSD=relativt standardavvik. Gjenvinning regnet mot teoretisk verdi, teoretisk verdi er målte 100 ng/L ZrO₂ NP resultater uten matriks.

Prøvetype	N	Parameter	Partikkel- antall	Partikkelantall- konsentrasjon (Partikler/L)	Masse- konsentrasjon (ng/L)	Total- konsentrasjon (ng/L)	Snitt størrelse (nm)	Median størrelse (nm)	Hyppigst størrelse (nm)
ZrO ₂ NPer i blåskjell spiket før enzym- behandling	2	Gjennomsnitt	1190	2,5·10 ⁷	54	141	74	65	47
		Min-maks	1182-1197	2,5·10 ⁷ -2,5·10 ⁷	54-54	141-141	73-75	64-66	46-48
		Teoretisk verdi	690	1,45·10 ⁷	43	45	80	69	57
		Gjenvinning (%)	173	173	127	315	92	94	85
ZrO ₂ NPer i blåskjell spiket før enzym- behandling ¹	3	Gjennomsnitt	762	1,7·10 ⁷	72	199	86	69	46
		Min-maks	710-807	1,6·10 ⁷ -1,8·10 ⁷	63-86	190-216	85-88	66-71	46-46
		RSD (%)	6,4	6,4	17	7,7	1,6	4,0	-
		Teoretisk verdi	809	1,8·10 ⁷	69	154	87	75	56
		Gjenvinning (%)	94	93	105	129	99	92	82
ZrO ₂ NPer i blåskjell spiket etter enzym- behandling ¹	3	Gjennomsnitt	416	9,3·10 ⁶	51	174	81	62	47
		Min-maks	337-459	7,5·10 ⁶ -1,0·10 ⁷	42-62	158-188	78-84	59-64	46-50
		RSD (%)	16	16	21	8,6	3,7	4,1	4,9
		Teoretisk verdi	809	1,8·10 ⁷	69	154	87	75	56
		Gjenvinning (%)	51	51	74	113	94	83	85

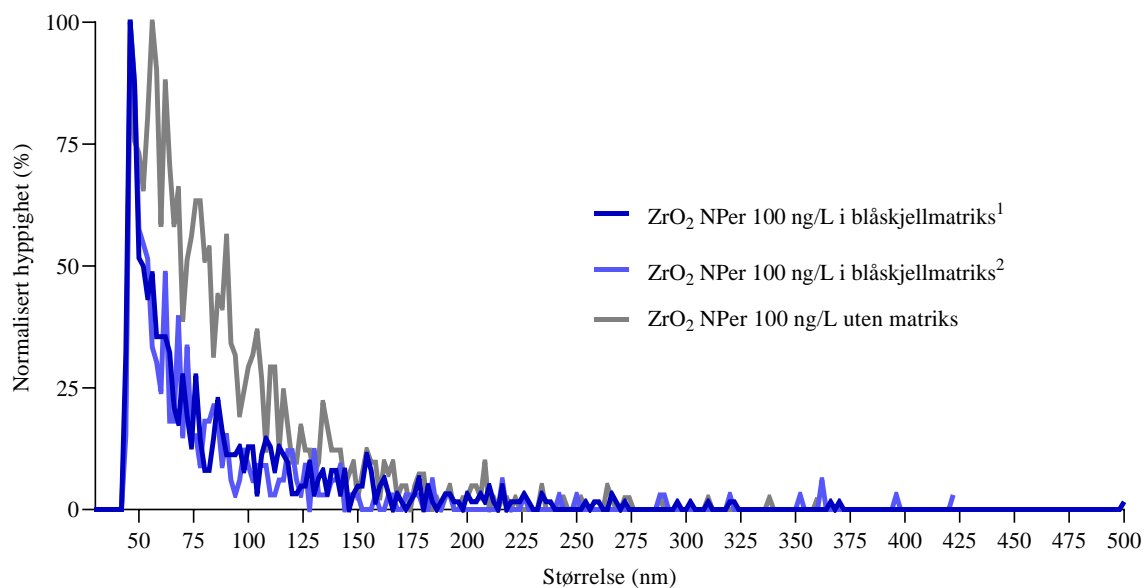
¹Spiket med 100 ng/L CeO₂ NPer også



Figur 4.20 Partikkelantall og massekonsentrasjon (A), og gjennomsnitt, median og mest hyppigste størrelse (B) gjenvinningsverdier (%) for 0,1% natriumsitrat stabiliserte ZrO₂ <100 nm NPer 100 ng/L i blåskjellmatrisk spiket før og etter enzymbehandling. ¹Inneholder 100 ng/L CeO₂ NPer også. Gjenvinning regnet mot målte 100 ng/L ZrO₂ NP resultater uten matris. Feilfelt gitt som standardavvik.



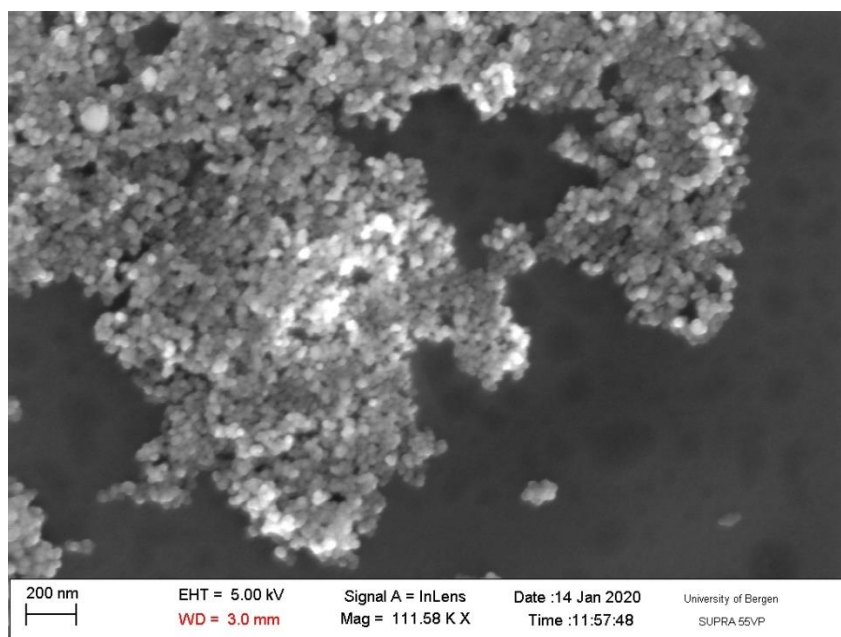
Figur 4.21 Normalisert hyppighet (%) av partikkelstørrelsene til 0,1% natriumsitrat stabiliserte ZrO₂ NPer <100 nm 100 ng/L i Milli-Q[®] vann og blåskjellmatris spiket før enzymbehandling.



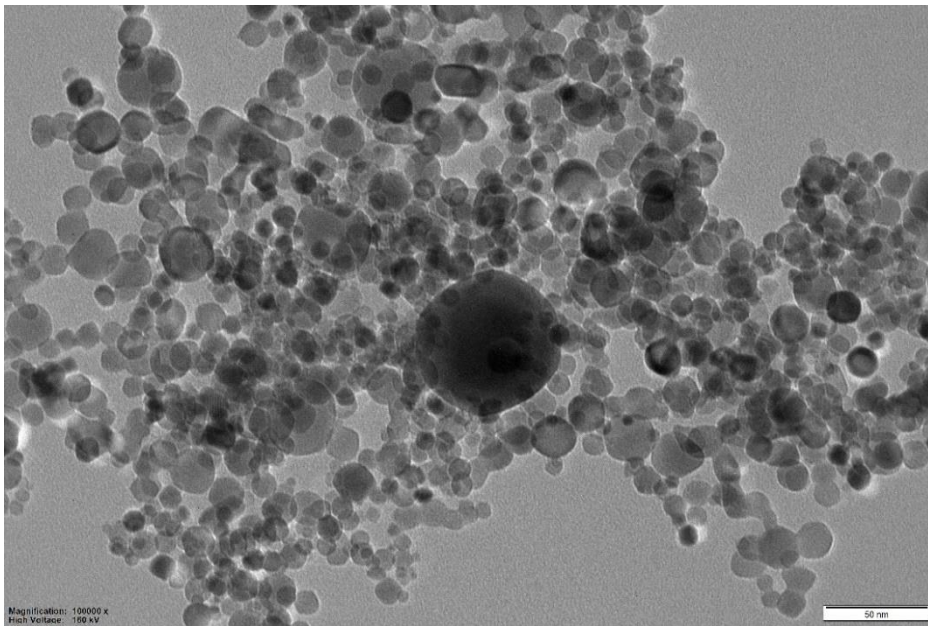
Figur 4.22 Normalisert hyppighet (%) av partikkelstørrelsene til ZrO_2 NPer <100 nm 100 ng/L i Milli-Q® vann og blåskjellmatriks.¹Spiket før enzymbehandling. ²Spiket etter enzymbehandling. ZrO_2 NPene var stabilisert med 0,1% natriumsitrat.

4.5.2 Elektronmikroskopi (SEM og TEM)

Ut ifra SEM og TEM bildene (figur 4.23 og 4.24) var mange av ZrO_2 NPene tilnærmet sfæriske og størrelsen var stort sett under 100 nm. Mange av de observerte NPene på TEM bildet hadde en størrelse på <20 nm, en andel var også rundt 5 nm. NPene av større størrelser ble også observert på 30 – 70 nm.



figur 4.23 ZrO_2 NPer <100 nm i 0,1% natriumsitrat 50 mg/L analysert med SEM (ZEISS SUPRA 55VP)



figur 4.24 ZrO_2 NPer <100 nm i 0,1% natriumsitrat 50 mg/L analysert via TEM (JEOL 2100)

4.6 Zirkonium og cerium nanopartikler i blåskjell

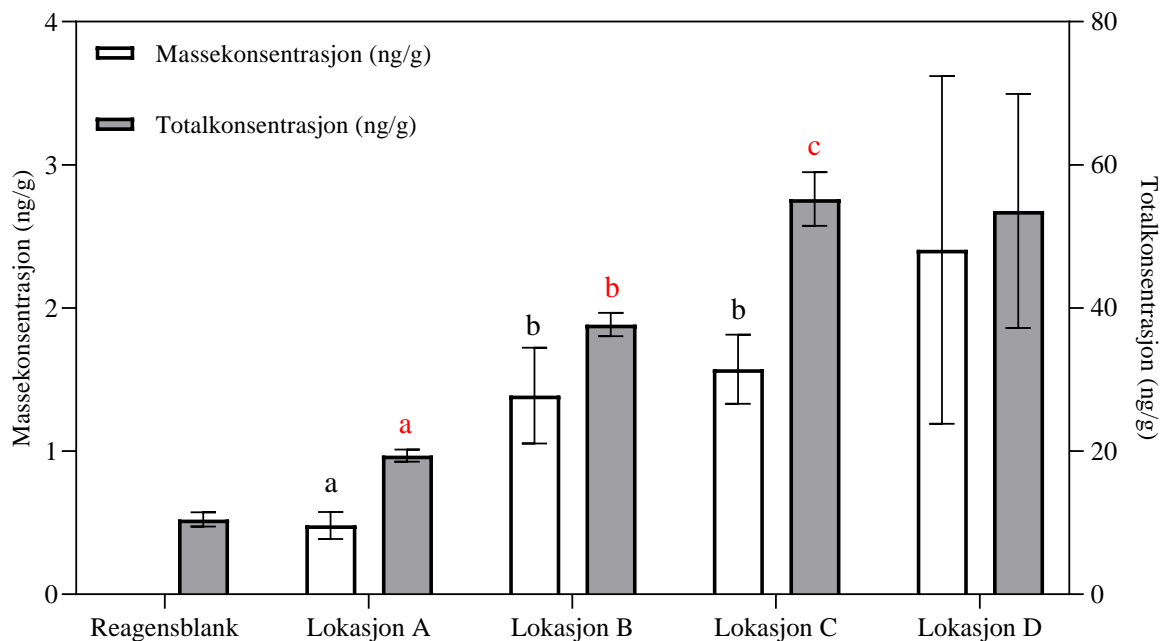
4.6.1 Cerium nanopartikler i blåskjell

I figur 4.25 og tabell 4.10 viser resultater fra bestemmelse av Ce NPer fra analyser av blåskjell fra fire ulike steder. Plass A er fra et overvåkningsprosjekt, plass B er fra Vågen (Bergen), plass C er fra et dyrkningsanlegg og plass D er av det samme overvåkningsprosjektet som A men trolig fra en annen plass. Partikkelantallet, massekonsentrasjonen og totalkonsentrasjonen målt i skjellene er oppgitt per gram våtvekt blåskjell. Lokasjon-C hadde høyest totalkonsentrasjon med 55 ng/g, fulgt av Lokasjon-D med 54 ng/g, Lokasjon-B med 38 ng/g og Lokasjon-A med 19 ng/g. Lokasjon D hadde høyest massekonsentrasjon på 2,4 ng/g, fulgt av lokasjon C, B, og A med en massekonsentrasjon på henholdsvis 1,6, 1,4 og 0,5 ng/g. Alle stedene var over LOQ for massekonsentrasjonen, for totalkonsentrasjonen var lokasjon-D og C over LOQ, og Lokasjon-A og B var over LOD men under LOQ. Ingen NPer ble detektert i reagensblankene som inneholdt enzymløsning. Størrelsesparameterne (gjennomsnitt, median og hyppigst størrelse) fra de ulike stedene varierte mellom 30-43 nm. Lokasjon A viste seg å ha en signifikant ulik massekonsentrasjon sammenlignet med lokasjon B og C ($p=0,03$). For totalkonsentrasjonen var lokasjonene A, B og C signifikant ulik fra hverandre ($p<0.0001$). Lokasjon D ble ikke inkludert i enveis ANOVA-testen ettersom kravet til normalitet og

homogen varians ikke var oppfylt, og det var heller ikke ønskelig å benytte en ikke-parametrisisk ANOVA- test.

Tabell 4.10 Partikkelantall, partikkelkonsentrasjon, massekonsentrasjon, totalkonsentrasjon og størrelse (gjennomsnitt, median og hyppigst størrelse) resultater gitt som gjennomsnitt, og RSD for Ce i blåskjellprøver fra fire ulike lokasjoner (A, B, C, D). RSD=relativt standardavvik. LOD (deteksjonsgrense) LOQ (kvantifiseringsgrense) er regnet fra reagensblank med enzymløsning i. Resultat gitt per gram våt blåskjell.

Prøvetype	N	Parameter	Partikkel- antall	Partikkelantall- konsentrasjon (Partikler/g)	Masse- konsentrasjon (ng/g)	Total- konsentrasjon (ng/g)	Gjennomsnitt -størrelse (nm)	Median størrelse (nm)	Hyppigst størrelse (nm)
Reagensblank	3	Gjennomsnitt	0	0	0	10	-	-	-
		LOD	-	-	-	13	-	-	-
		LOQ	-	-	-	40	-	-	-
Lokasjon A	3	Gjennomsnitt	108	$2,4 \cdot 10^6$	0,5	19	34	31	30
		RSD (%)	7,1	7,1	20	4,3	1,1	0,9	-
Lokasjon B	3	Gjennomsnitt	176	$3,9 \cdot 10^6$	1,4	38	40	36	34
		RSD (%)	5,2	5,2	24	4,3	2,6	1,7	-
Lokasjon C	3	Gjennomsnitt	239	$5,3 \cdot 10^6$	1,6	55	39	36	34
		RSD (%)	11	11	15	6,8	2,0	1,6	-
Lokasjon D	4	Gjennomsnitt	240	$5,3 \cdot 10^6$	2,4	54	43	38	36
		RSD (%)	92	111	107	50	1,3	0,8	-



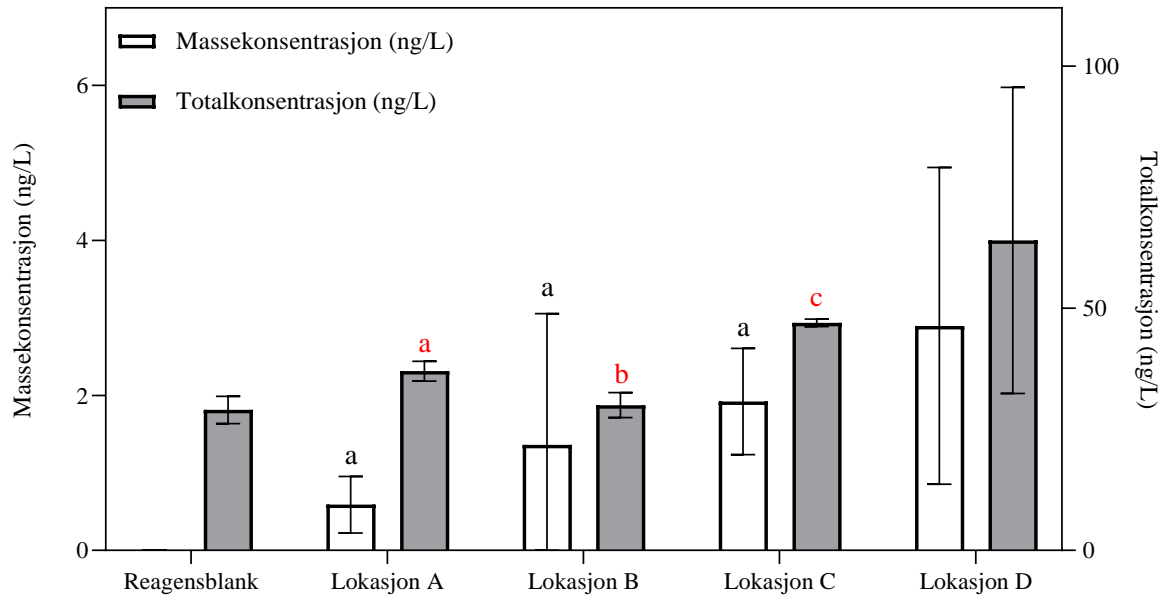
Figur 4.25 Gjennomsnitt av masse- og totalkonsentrasjon for Ce i blåskjellprøver fra fire ulike lokasjoner, feilfelt gitt som standardavvik. Ulike røde bokstaver indikerer signifikante forskjeller for totalkonsentrasjon, mens svarte indikerer for massekonsentrasjon ($p < 0,05$).

4.6.2 Zirkonium nanopartikler i blåskjell

I figur 4.26 og tabell 4.11 er resultater av Zr NPer i blåskjell fra fire ulike steder. Plass A er fra et overvåkningsprosjekt, plass B er fra Vågen (Bergen), plass C er fra et dyrkningsanlegg og plass D er av det samme overvåkningsprosjektet som A, men er trolig fra en annen plass. Partikkelantallet, massekonsentrasjonen og totalkonsentrasjonen er oppgitt per gram våt blåskjell. Av lokasjonene hadde D høyest totalkonsentrasjon på 64 ng/g, fulgt av C med 47 ng/g, A med 37 ng/g og B med 30 ng/g. Ingen av lokasjonene hadde en totalkonsentrasjon over LOQ, men alle var over LOD. Lokasjon-D hadde høyest massekonsentrasjon på 2,9 ng/g, fulgt av C med 1,9 ng/g, B med 1,4 ng/g og A med 0,6 ng/g. Alle lokasjonene hadde en massekonsentrasjon over LOQ. Størrelsen (gjennomsnitt, median og hyppigst) til NPene varierte mellom 35-57 nm. Lokasjon A, B og C hadde ikke signifikant ulik massekonsentrasjoner fra hverandre ($p=0,4$). Imidlertid viste totalkonsentrasjonene seg til å være signifikant ulik for A, B og C ($p=0.0002$). Lokasjon D ble ikke inkludert i enveis ANOVA-testen av samme grunner som i kap. 4.6.1

Tabell 4.11 Partikkelantall, partikkelkonsentrasjon, massekonsentrasjon, totalkonsentrasjon og størrelse (gjennomsnitt, median og hyppigst størrelse) resultater gitt som gjennomsnitt, og RSD for Zr i blåskjellprøver fra fire ulike lokasjoner (A, B, C, D). RSD=relativt standardavvik. LOD (deteksjonsgrense) LOQ (kvantifiseringsgrense) er regnet fra reagensblank med enzymløsning i. Resultat gitt per gram våt blåskjell.

Prøvetype	N	Parameter	Partikkel- antall	Partikkelantall- konsentrasjon (Partikler/g)	Masse- konsentrasjon (ng/g)	Total- konsentrasjon (ng/g)	Gjennomsnitt- størrelse (nm)	Median størrelse (nm)	Hyppigst størrelse (nm)
Reagensblank	3	Gjennomsnitt	1	$1,1 \cdot 10^4$	0,003	29	30	30	31
		LOD	2	$4,45 \cdot 10^4$	0,01	37	-	-	-
		LOQ	6	$1,3 \cdot 10^5$	0,04	112	-	-	-
Lokasjon A	3	Gjennomsnitt	47	$2,1 \cdot 10^6$	0,6	37	45	41	37
		RSD (%)	17	17	62	5,4	4,5	3,6	8,3
Lokasjon B	3	Gjennomsnitt	30	$1,3 \cdot 10^6$	1,4	30	47	40	35
		RSD (%)	15	15	15	124	8,8	13	2,0
Lokasjon C	3	Gjennomsnitt	101	$4,5 \cdot 10^6$	1,9	47	50	43	39
		RSD (%)	4,8	4,8	36	1,6	3,1	1,1	2,9
Lokasjon D	5	Gjennomsnitt	89	$3,7 \cdot 10^6$	2,9	64	57	47	42
		RSD (%)	104	120	71	49	8,8	5,5	11



Figur 4.26 Gjennomsnitt av masse- og totalkonsentrasjon for Zr i blåskjellprøver fra fire ulike lokasjoner, feilfelt gitt som standardavvik. Ulike røde bokstaver indikerer signifikante forskjeller for totalkonsentrasjon, mens svarte indikerer for massekonsentrasjon ($p < 0,05$).

5. Diskusjon

5.1 sp-ICP-MS metoden og opparbeiding av suspensjoner av nanopartikler

Som nevnt i teoridelen (kap 2.4.2) ønsker man å analysere prøver med et partikkelantall hvor flest mulig separate partikler blir detektert ved sp-ICP-MS analyse. NP konsentrasjonsområde benyttet på 100 ng/L – 1 µg/L virket til å være tilstrekkelig fortynnet for prøvene analysert, ettersom at det var god plass mellom enkelt NP-signaler i de tidsoppløste råsignalplottene, noe som indikerer at det ikke var mye signaloverlapp.

Enkelte ganger ble det observert sporadisk drift hos de ioniske standardene benyttet i analysene. For å håndtere driften ble det passet på at de ioniske standardene viste forventede verdier og stabile råsignaler. Ved avvikende målinger ble det benyttet grep som reanalyse av de ioniske standardene, inntil man fikk normale verdier og signaler. Siden de ioniske standardene ofte ble påvirket av drift kan det stilles spørsmål ved om drift kan ha påvirket enkelte NP-prøver også. Dessverre er det mer utfordrende å påpeke drift i NP-prøver, ettersom man ikke kan observere det like tydelig som i råsignalene til ioniske standarder. Som El Hadri, Petersen, og Winchester (2016) påpeker vil drift i form av sensitivitetstap være direkte proporsjonalt med NP massen, imens et sensitivitets tap på 50% tilsvarer en reduksjon i partikkelstørrelse på 21%. I NP-prøver kan driften potensielt oppdages hvis prøver har store avvikende verdier, men dette innebærer at man må ha et estimat på hvilke verdier en prøve vil gi. Opptrer driften i en del av en prøvesekvens hvor f.eks. ukjente prøver måles, kan det være vanskelig å påpeke om verdiene er avvikende, ettersom man ikke har noen formening om hvilke verdier som kan forventes. Det kan derfor ikke utelukkes om drift kan ha påvirket enkelte NP-målinger i dette prosjektet. Et mulig virkemiddel for å oppdage avvikende prøver som følger av drift, er et utstrakt bruk av paralleller, hvor man kan sammenligne om det er samsvar mellom dem. Det virket ikke som driften hadde påvirket mange NP-prøver i en stor grad, da flere NP-prøver (f.eks. CeO₂ og Au) målt utover flere dager hadde en lav variasjon mellom paralleller. Valideringen med PerkinElmer NPene som ble gjennomført over fem ulike dager hadde også en lav spredning mellom prøvene.

Det er mange faktorer ved opparbeidingen av NP-prøver som potensielt kan påvirke analyseresultatene. NPer kan blant annet agglomerere og sedimentere (Weigel, Peters, Loeschner, Grombe, & Linsinger, 2017), enkelte NPer kan løse seg opp (f.eks. Zn) og de kan potensielt også adsorbere til overflater (Montoro Bustos, Petersen, Possolo, & Winchester, 2015). Eksempelvis viste leverandørsuspensjonen av ZrO₂ NPer 5% seg å være svært ustabil, da NPer sedimenterte fort og et faseskille oppsto i løpet av få minutter (vedlegg 1.1). Dette vil bidra til å gjøre det utfordrende å hente ut alikvoter som er representativ av leverandørsuspensjonen, og kan igjen bidra til å skape variasjon mellom ulike alikvoter. I et forsøk på å få representative og sammenlignbare alikvoter, ble alltid alikvoter hentet ut hurtig etter at stamsuspensjoner og leverandørsuspensjoner hadde blitt ristet for hånd.

5.2 Gull 60 nm nanopartikler

Au NPene brukt som referansemateriale viste å være relativt robust, hvor TE viste stabile verdier, og de resterende parameterne hadde liten variasjon. Resultatene viste også godt samsvar til en valideringsrapport som andre analytikere/operatører ved HI har gjort tidligere. NanoComposix Au NPene viste andre resultater sammenlignet med PerkinElmer NPene, gjenvinningen var høyere og størrelsesfordelingen var bredere for NPene fra NanoComposix. At referansematerialene gav ulike resultater virker rimelig ettersom NPene kom fra to ulike leverandører som kan ha brukt ulike syntesemetoder og/eller betingelser under syntesen, som kan resultere i ulike produkter med ulike størrelser. PerkinElmer NPene var også eldre, dette kan ha påvirket mengden suspenderte NPer via prosesser som adsorbering til overflater, agglomerering og sedimentering, som følgelig gir lavere gjenvinning for partikkelantallet.

TE ble høyere når et intervall ble brukt istedenfor kun en nedre størrelsebestemmelsesgrense. Bruk av PerkinElmer NPene til bestemmelse av TE gjorde eksempelvis at denne økte fra 5,7 - 6,1 %. Et intervall ble benyttet istedenfor en nedre størrelsebestemmelsesgrense på bakgrunn av at det er signalintensiteten til 60 nm NPer som er av interesse, siden TE beregnes med utgangspunkt i at partiklene er 60 nm. Som nevnt i kap. 3.6 kan man utelukke NPene som trolig ikke er 60 nm ved å sette størrelsebestemmelsesgrensen som et intervall. For de resterende analysene i dette prosjektet ble det derfor benyttet et intervall for å bestemme TE.

TE er en kritisk parameter for resultatene til sp-ICP-MS (Pace et al., 2011). Parameteren er involvert i mange av formlene som gir sp-ICP-MS resultatene (bl.a. partikkelkonsentrasjonen og massen til NPene, og følgelig deres størrelse). Derfor vil feil i denne parameteren kunne påvirke resultatene i stor grad. TE kan regnes ut via manuell bestemmelse, hvor målinger blir gjort på forholdet mellom mengden væske som går inn i instrumentet og mengden som går tapt i spraykammeret som avfall. Alternativt kan TE også bestemmes ved bruk av en NP-standard, hvor enten størrelsen til NPene benyttes (partikkelstørrelsemetoden) eller gjenvinningen av antallet NPer (partikkelantallmetoden) (se kap. 2.4.2-2.4.3). Den manuelle metoden er ikke anbefalt ettersom metoden har en dårlig nøyaktighet, metoden er utsatt for en rekke feilkilder som bl.a. fordampning (Montaño et al., 2016). Pace et al. (2011) rapporterte også at den manuelle metoden overestimerte TE. For å bruke partikkelantallmetoden må man være sikker på at referansematerialet har det riktige partikkelantallet. Er partikkelantallet lavere enn forventet grunnet tap av partikler vil TE undervurderes (Montaño et al., 2016). I dette prosjektet har partikkelstørrelsemetoden blitt benyttet, ettersom en validering hos HI viste at metoden var mer robust enn partikkelantallmetoden (manuskript i arbeid). Valideringsrapporten viste også at TE ble lavere ved bruk av partikkelantallmetoden, trolig grunnet tap av partikler i standarden. Murphy, Liu, Montoro Bustos, Johnson, og Winchester (2016) rapporterte tilsvarende resultater hvor TE ble undervurdert med partikkelantallmetoden. De rapporterte også at partikkelstørrelsemetoden gav resultater med mindre variasjon. En fordel med partikkelstørrelsemetoden er at den ikke er like sensitiv i forhold til tap av NPer som partikkelantallmetoden (Murphy et al., 2016). Knyttet til bestemmelse av TE er ikke størrelsesmetoden heller feilfri – I mange tilfeller er NPene sin tetthet en antatt verdi, feilestimering av denne verdien vil kunne bidra til feil i transporteffektiviteten (Montaño et al., 2016). Feil i størrelsen til NPene vil også bidra til feil i transporteffektiviteten, men komplementære teknikker som elektronmikroskop kan benyttes for å verifisere størrelsen til NPene. Dette ble vist i Grødem (2020) sitt arbeid hvor feil i den oppgitte størrelsen til NP-standardene resulterte i en overvurdert TE, men resultatene ble bedre da størrelsen til NPene ble korrigert til størrelsen funnet etter TEM-analyse av NPene. I denne oppgaven ble TEM og SEM benyttet for å kartlegge størrelsen til PerkinElmer NPene. Fra observasjonene i TEM varierte størrelsen mellom 46-67 nm, men gjennomsnittet på 57 nm var i nærheten av den nominelle på 60 nm. NanoComposix Au NPene ble ikke analysert via elektronmikroskop, men leverandøren hadde karakterisert NPene med TEM. De rapporterte at NPene hadde en størrelse på 63 ± 7 nm (\pm SD) (vedlegg 2.1).

TE-verdien til PerkinElmer og NanoComposix NPene ble målt til mellom 5,5-6,9% avhengig av NPene brukt og hvordan størrelsebestemmelsesgrensen ble satt (intervall eller nedre grense). I en studie med flere laboratorier som deltakere varierte verdien mellom 1,4-17% (Montoro Bustos et al., 2015). TE målt for PerkinElmer og NanoComposix NPene faller inn under intervallet gitt i det interlaboratoriestudiet, men som Pace et al. (2011) påpeker er TE en verdi som er avhengig av instrumentet, hvor verdien kan variere mellom ulike instrumenter og instrumentoppsett.

5.3 Kobber(II)oksid <100 nm nanopartikler

CuO NPene gav både et lavt partikkelantall og lav massekonsentrasjon. Totalkonsentrasjonen til prøvene viste høyere verdier enn massekonsentrasjonen, noe som trolig henger sammen med det høye bidraget fra vannblankene (vedlegg 3.11). Den høye totalkonsentrasjonen for vannblankene kan komme av polyatomiske interferenser ettersom at det er en del interferenser ved m/z -verdien på 63 (f.eks.: $^{31}\text{P}^{16}\text{O}_2^+$, $^{40}\text{Ar}^{23}\text{Na}^+$, $^{23}\text{Na}^{40}\text{Ca}^+$, $^4\text{N}^{12}\text{C}^{37}\text{Cl}^+$, $^{46}\text{Ca}^{16}\text{O}^+\text{H}^+$ og $^{36}\text{Ar}^{12}\text{C}^{14}\text{N}^+\text{H}^+$) (May & Wiedmeyer, 1998). Mellom paralleller viste massekonsentrasjonen også store variasjoner hvor 100 ng/L prøvene hadde en RSD på 57%. Den store graden av variasjon i massekonsentrasjonen kommer trolig av variasjoner i størrelsen til NPene. Det kommer tydelig frem at et fåtall store partikler på over 300 nm kan forskyve massekonsentrasjon til resultatene vesentlig. I et tilfelle utgjorde tre partikler over 300 nm 30% av massekonsentrasjonen til en prøve, imens i en annen parallell var det ingen partikler over 300 nm. Ettersom det er store variasjoner mellom prøvene, med tanke på hvor mange store NPer de inneholdt, blir det ustabile og lite konsistente resultater. Mindre variasjon mellom parallellene kan oppnås dersom de større NPene (>300 nm) blir ekskludert i sp-ICP-MS programvaren, men samtidig vil man også kutte ut et potensielt bidrag til massekonsentrasjonen.

Sp-ICP-MS resultatene viste et relativt bredt spekter av størrelser der NPer mellom 30-582 nm ble målt. En stor andel av de detekterte NPene var i størrelsesorden 30-250 nm. Dette samsvarte godt med SEM resultatene hvor NPer mellom 37-207 nm ble observert. Større partikler på over 300 nm ble ikke observert med SEM. Dette kan tyde på at noen av de større NPene var i form av agglomerater. Som Weigel et al. (2017) påpeker forventes større partikler i form av agglomerater å senke gjenvinningen for massekonsentrasjon. Ettersom disse NPene med en stor masse er i mindretall, og sannsynligheten for å få målt slike NPer er lavere. Det er også

sannsynlig at agglomeratene kan sedimentere under analysen/opparbeidingen. At sannsynligheten er mindre for at de større NPene blir målt samsvarer med diskusjonen i avsnittet ovenfor, hvor det ble påpekt at det var variabelt om det ble målt NPer på over 300 nm i parallellene. Imidlertid kan det være utfordrende å påpeke om de større NPene skyldtes agglomerater: Det kan være at større ikke-agglomererte partikler ikke ble observert i SEM-bildene på grunn av at de store partiklene var i et fåtall. En generell utfordring med elektronmikroskopi er at få partikler blir målt, noe som resulterer i dårlig statistikk i forhold til bestemmelse av størrelsesfordeling (Bootz, Vogel, Schubert, & Kreuter, 2004). For å få et representativt bilde av størrelsesfordelingen til polydisperse NPer med elektronmikroskopi kreves det at det blir målt et stort antall partikler (Lopez-Sanz, Bernardo, Martin-Doimeadios, & Rios, 2019). Uavhengig om de større partiklene var i form av frie partikler eller agglomerater, fører de til en dårlig statistikk på resultatene. En annen ulempe med større partikler er at de potensielt kan gi en lavere signalrespons ved sp-ICP-MS analyse, som følger av ufullstendig fordampning i plasmaet (Lee & Chan, 2015; Olesik & Gray, 2012).

På SEM-bildene så det også ut til være en populasjon av NPer med mindre størrelser, disse ble ikke målt ettersom de ikke kom tydelig nok fram på bildene. Leverandøren av CuO NPene analyserte NPene med TEM. Siden TEM-instrumenter har en høyere oppløsning er det mulig at leverandøren har klart å måle en andel NPer som er mindre enn de som ble observert med SEM i dette prosjektet. Det er også mulig at CuO NP-prøvene på <50 nm inneholdt en andel NPer som var for små for sp-ICP-MS instrumentet. Med en størrelsebestemmelsesgrense på 30 nm kan det være at mange NPer ikke ble detektert, ettersom NPene havnet under størrelsebestemmelsesgrensen. Dette kan være med på å forklare den lave gjenvinningen for CuO NPene. For å videre utforske dette kunne en TEM analyse av NPene vært hensiktsmessig, men dette ble ikke gjort siden TEM-instrumentet ikke var tilgjengelig i tidsrommet det var planlagt å analysere NPene (instrumentet trengte reparasjon).

Bruk av sitronsyre, natriumsitrat, PVP-10 og PVP-40 (0,1%) som stabilisatorer gav ikke bedre resultater sammenlignet mot de ustabiliserte NPene. Natriumsitrat gav de best resultatene av alle stabilisatorene, men gav fortsatt tilsvarende resultater som de ustabiliserte NPene. PVP-10, PVP-40 og sitronsyre gav lavere målinger enn de ustabiliserte NPene. I tillegg til å gi lave målinger ga PVP-10 og PVP-40 et faseskille (vedlegg 1.2) når prøvene ble lagret over lengre tid (>25 dager). Suspensjonene med PVP var vanskelig å få homogen igjen etter at faseskille hadde oppstått. Dette kan indikere at PVP ikke er egnet som stabilisator for lengre lagringstider i de konsentrasjonene av PVP og CuO NPer benyttet her. Sitronsyren virket å løse opp en andel

av NPene, siden signaler som ligner på ioniske signaler ble observert i de tidsoppløste råsignalplottene (vedlegg 5.1). At sitronsyre løste opp en andel NPer virker som en mulighet ettersom Peng, Shen, et al. (2017) viste at 0,01% sitronsyre løste opp 20% av en 100 mg/L suspensjon av CuO NPer, i dette prosjektet ble det benyttet 0,1%. Dette kan også forklare den lave partikkelmassekonsentrasjonen som ble målt for prøvene med sitronsyre. Sitronsyren kan ha gitt suspensjonen en lavere pH-verdi, som videre kan ha ført til at CuO NPene løste seg opp. Det er blitt påpekt at løseligheten til CuO øker ved lavere pH-verdier (Peng, Shen, et al., 2017).

5.4 Sink(II)oksid <100 nm nanopartikler

Ved analyse av ZnO NPene med sp-ICP-MS ble det ikke detektert noen NPer, dette tyder på at NPene kan ha løst seg opp. Det var vanskelig å konkludere om det ble målt noen Zn-ioniske signaler fra oppløste NPer. En Zn konsentrasjon på 100 ng/L er i området for bestemmelsesgrensen til ionisk Zn, ettersom instrumentblankene viste høye Zn-signaler. Det er blitt påpekt av flere at ZnO er utfordrende å måle med sp-ICP-MS grunnet høy løselighet (Frechette-Viens, Hadioui, & Wilkinson, 2019; Hadioui, Merdzan, & Wilkinson, 2015; Reed, Higgins, Westerhoff, Tadjiki, & Ranville, 2012). Reed et al. (2012) viste at ingen NPer ble detektert via sp-ICP-MS for ZnO NPer av en størrelse på 130 nm. Wang, Tong, Xie, og Gaillard (2016) viste også at ZnO NPer løste seg hurtig opp ved en konsentrasjon på 600 µg/L. På bakgrunn av studiene virker det som en mulighet at ZnO NPene kan ha løst seg opp. Enkelte har klart å måle ZnO NPer med sp-ICP-MS (Donovan et al., 2016), men her ble det benyttet en høyere partikkelkonsentrasjon (70 µg/L) og større NPer (80-200 nm). Løseligheten til ZnO NPer er avhengig av partikkelstørrelsen, konsentrasjonen og pH: NPene løser seg fortere opp ved mindre størrelser (Mudunkotuwa, Rupasinghe, Wu, & Grassian, 2012), lavere konsentrasjoner (Li & Wang, 2013) og lavere pH-verdier (Li, Lin, & Zhu, 2013).

5.5 Cerium(IV)oksid <50 nm og 30-50 nm nanopartikler

5.5.1 Cerium(IV)oksid <50 nm nanopartikler

Suspensjoner av CeO₂ NPer laget fra pulverform gav lave resultater for prøvene på 100 ng/L med en massekonsentrasjon på <10 ng/L, partikkelantall på 157 og totalkonsentrasjon på <10 ng/L. At CeO₂ fra pulverform gav en lav gjenvinning kan være knyttet til ulike faktorer. Som nevnt tidligere kan NPer gjennomgå ulike prosesser (oppløsning, agglomerering og adsorbering til overflater). NPene har trolig ikke løst seg opp ettersom CeO₂ NPer er kjent for lav løselighet i vann (Dan et al., 2016). Det kan også settes spørsmål på hvor stor andel av NPene som faktisk vil være målbar med sp-ICP-MS. Med en størrelse på <50 nm er det godt mulig at mange NPer er for små, og at en stor andel av NPene havner under størrelsebestemmelsesgrensen. SEM-bildene gav ikke entydig informasjon om størrelsen til NPene, siden at kvaliteten på bildet var dårlig og få NPer ble observert. På bildene var det indikasjoner på at noen NPer var på <100 nm, men det var også partikler på >1 µm. Det er usikkert om partiklene på >1 µm faktisk var partikler eller bare skyldtes den dårlige kvaliteten på bildene. For å trekke en konklusjon på hva som kan ha bidratt til den lave gjenvinningen hadde det vært hensiktsmessig med en bedre karakterisering av NPene med SEM og eventuelt TEM når dette er mulig igjen.

5.5.2 Cerium(IV)oksid 30-50 nm nanopartikler

CeO₂ NPene laget fra leverandørsuspensjonen viste relativt stabile resultater med en lav spredning på mange parametere (<10% RSD). CeO₂ NPene fra leverandørsuspensjonen gav også høyere målinger enn NPene fra pulverform, hvor 100 ng/L prøver fra pulverform gav en massekonsentrasjon på <10 ng/L, men NPene fra leverandørsuspensjonen gav en massekonsentrasjon på omtrent 50 ng/L. NPene som ble detektert hadde en størrelse i intervallet 22-218 nm (i prøver uten blåskjellmatriks). Gjennomsnittet, medianen og den mest hyppigste størrelsen på 29-50 nm viste seg å være i nærheten av den oppgitte størrelsen på 30-50 nm. Andre har rapportert tilsvarende størrelsesfordeling for CeO₂ 20-50 nm NPer ved sp-ICP-MS analyse, hvor størrelsen varierte mellom ca. 20-200 nm (Dan et al., 2016; Donovan et al., 2016). SEM-resultatene av CeO₂ NPene gav ikke tilstrekkelig informasjon om NPene ettersom få NPer ble observert. Det kom bare fram at enkelte NPer med varierende form var mindre enn 100 nm, og at noen NPer var i intervallet 100-150 nm.

Det ble forsøkt å stabilisere NPene med 2,5% eddiksyre ettersom leverandøren leverte NPene i 2,5% eddiksyre. Det å fortynne prøvene i 2,5% eddiksyre virket ikke å forbedre resultatene, siden tilsvarende resultater ble observert i NPene uten eddiksyre. Når en mindre fersk stamsuspensjon (75 dager gammel) ble benyttet ble gjenvinningen lavere og størrelsen til NPene ble større. Dette kan tyde på at NPene har agglomerert, eller at NPene av mindre størrelser har gått tapt via adsorpsjon til overflater. Dette viser at lagringstiden til stamsuspensjoner kan være en variabel som er viktig å kontrollere. Effekten av lagringstiden på ulike NPer er noe som bør undersøkes videre.

5.6 Zirkonium(IV)oksid <100 nm nanopartikler

ZrO₂ NPer ble analysert både med og uten natriumsitrat som stabilisator. Tre ulike former for stabiliserte prøver ble analysert: en prøvevariant ble stabilisert bare ved å lage stamsuspensjonen i 0,1% natriumsitrat og ble deretter videre fortynnet i Milli-Q[®] vann fram til analyse. Det samme ble gjort med en annen prøvevariant bare at det ble benyttet en stamsuspensjon med 0,5% natriumsitrat, den siste prøvevarianten ble stabilisert ved stamsuspensjonen med 0,1% natriumsitrat og ble videre fortynnet i 0,1% natriumsitrat fram til analyse. Prøvene som var stabilisert bare ved stamsuspensjonen med 0,1% natriumsitrat gav høyere partikkelantallmålinger sammenlignet med de ustabiliserte prøvene. Det ble ikke observert en like stor forskjell for massekonsentrasjonen ettersom at feilfeltene overlappet mye. Prøvene stabilisert bare ved stamsuspensjonen med 0,5% natriumsitrat gav tilsvarende målinger som prøvene stabilisert med 0,1% natriumsitrat ved stamsuspensjonen. ZrO₂ NPene som ble stabilisert ved stamsuspensjonen, og som ble videre fortynnet i 0,1% natriumsitrat, skilte seg mer fra de andre prøvene med et høyere partikkelantall og massekonsentrasjon. Flere har rapportert at sitrationer kan ha en stabiliserende effekt på ulike metalloksid NPer som TiO₂ (Mudunkotuwa & Grassian, 2010; Raza et al., 2016) og Fe_xO_y (Tancredi, Veiga, Garate, & Ybarra, 2019; Tombácz et al., 2013). I studiene adsorberes sitrationene til NPene og gir et mer negativt zetapotensiale til NPene ved enkelte pH-intervaller. Effekten sitrationene har på NPene kan være avhengig av pH-verdien. Mudunkotuwa og Grassian (2010) viste at ved en pH på 2 ble sitratstabiliserte TiO₂ NPer destabilisert og agglomerering oppsto, mens suspensjonen ble mer stabil ved en pH-verdi på 6. Det er altså en mulighet for at sitrationene fra natriumsitrat kan ha hatt en stabiliserende effekt på ZrO₂ NPene, hvor effekten var størst hos prøvene som ble stabilisert ved stamsuspensjonen og ble videre fortynnet i natriumsitrat fram til analyse.

Stabiliseringen av NPene kan ha resultert i mindre agglomerering og sedimentering, som følgelig gir bedre gjenvinningsresultater. Dette kan potensielt også forklare størrelsesforskjellen observert mellom de stabiliserte og ustabiliserte prøvene, hvor NPene i de ustabiliserte prøvene hadde 8-20 nm større størrelser enn de stabiliserte. For å videre undersøke hvilken effekt natriumsitrat kan ha hatt på ZrO_2 NPene ville det vært hensiktsmessig å måle zetapotensialet til NPene med og uten stabilisator, for å se om natriumsitrat øker zetapotensialet til NPene og dermed kan gi økt stabilitet i pH-området som er blitt benyttet.

Fra TEM analysene ble en stor andel av NPene funnet til å være <20 nm, hvor av mange var rundt 5 nm i størrelsen. Større NPer ble også funnet på 30-70 nm. At mange av NPene ble funnet til å være under <20 nm viser at mange NPer ikke vil bli detektert med sp-ICP-MS ettersom størrelsebestemmelsesgrensen er satt til ca. 30 nm. Dette bidrar trolig til en lavere gjenvinning. Fra sp-ICP-MS resultatene ble NPer med størrelser mellom 30-480 nm detektert i prøver uten blåskjellmatriks. De fleste prøvene hadde NPer over 300 nm, men disse NPene var i et mindretall og det var variabelt hvor mange av de større partiklene som ble målt i prøvene. NPer på over 300 nm ble ikke observert med SEM, dette kan indikere at agglomerering kan ha tatt plass i prøvene. Imidlertid kan NPene på >300 nm også være ikke-agglomererte partikler som ikke ble observert i SEM siden disse var i mindretall. Akkurat som for CuO NPene (kap. 5.3) vil disse større partiklene kunne skape mer variasjon mellom paralleller, ettersom de har en større masse og det er variabelt hvor mange av partiklene som blir målt. Gjennomsnittet på 82-95 nm, medianen på 70-78 nm og den meste hyppigste størrelsen på 44-55 nm hos de stabiliserte og ustabiliserte prøvene samsvarer med leverandøren sin oppgitte størrelse på <100 nm. SEM og TEM resultatene samsvarer også med leverandørens spesifikasjoner.

5.7 Nanopartikler i blåskjell

5.7.1 Prøvematerialet

I dette prosjektet ble kommersielle blåskjell fra et overvåkningsprosjekt benyttet som testmatriks for å undersøke om man klarer å gjenvinne spikete NPer fra blåskjell gjennom behandlingen med enzymer. I en utvidelse av prosjektet ble det undersøkt om blåskjell fra ulike steder inneholdt NPer. I denne utvidelsen ble blåskjell fra tre ulike lokasjoner inkludert. Prøvene kom i fra stipendiat Are Sæle Bruvold fra Havforskningsinstituttet/UiB. Av disse skjellene var en samleprøve selvplukket fra Vågen i Bergen, den andre samleprøven var fra et dyrkningsanlegg og den siste samleprøven var fra det samme overvåkningsprosjektet som den opprinnelige testmatriksen. Selv om den ene gruppen av blåskjell var fra det samme overvåkningsprosjektet er de trolig fra ulike plasser, ettersom prosjektet samler inn skjell fra ulike lokasjoner og blåskjellene kom fra ulike partier og tider.

Noe som kan ha bidratt til å skape variasjoner mellom paralleller av blåskjellprøver er innveilingen av de homogeniserte blåskjellene før enzymbehandlingen. Når 1 g våtprøve skulle hentes ut av de homogeniserte blåskjellene var det tydelig at det var forskjeller mellom paralleller i forhold til hvor mye væske de inneholdt. Ulike mengder væske hos de innveide prøvene kan ha bidratt til å skape variasjoner mellom prøver. For å unngå for store forskjeller ble de homogeniserte prøvene blandet med en pasteurpipette før alikvoter ble tatt ut. En lengre behandling med homogenisator kunne potensielt ha gitt mer homogene prøver med mindre variasjon av væskeinnhold.

5.7.2 Enzymbehandling

For å bryte ned blåskjellene ble en enzymbehandling benyttet med protease fra *bacillus sp.*, hvor prøvene ble ristet via et inkubert ristebord i en time med en temperatur på 50 °C. For ekstraheringen av NPer ønsker man som Mozhayeva og Engelhard (2020) påpeker en metode som gir en høy gjenvinning av partiklene og ikke endrer på NPene sin form. Ettersom man ønsker å kvantifisere antallet NPer, massen og størrelsen i mest mulig uendret tilstand er det ikke aktuelt å benytte opplutningsmetoder som bruker f.eks. konsentrert syre som kan løse opp NPene. Av den grunn er det benyttet en mer skånsom behandling med enzymer i denne oppgaven.

Ekstrahering av NPer fra biologiskmateriale med ulike enzymer har blitt rapportert av flere, metoden er blitt benyttet på matriks av blant annet kylling (Loeschner et al., 2014; Loeschner et al., 2015; Peters et al., 2014; Weigel et al., 2017), viltkjøtt (Kollander et al., 2017), krabbepinner (Taboada-Lopez, Herbelo-Hermelo, Dominguez-Gonzalez, Bermejo-Barrera, & Moreda-Pineiro, 2019), ulike skjell (Taboada-Lopez, Alonso-Seijo, Herbelo-Hermelo, Bermejo-Barrera, & Moreda-Pineiro, 2019; Zhou et al., 2020), zebrafisk (Sung et al., 2018) og planter (Dan et al., 2016; Keller, Huang, & Nelson, 2018; Wojcieszek et al., 2019). Det blir rapportert at størrelsen til NPene ikke blir betydelig påvirket av enzymbehandlingen (Sung et al., 2018; Vidmar, Buerki-Thurnherr, & Loeschner, 2018; Zhou et al., 2020). Enkelte rapporterer en høy massekonsentrasjons gjenvinning med metoden 91-95% (Peters et al., 2014), 98-124% (Vidmar et al., 2018), mens andre rapporter en lavere gjenvinning 74% (Sung et al., 2018). Alle studiene er ikke direkte sammenlignbar med hverandre ettersom det benyttes ulike prosedyresteg og enzymer, men de gir likevel en indikasjon om enzymer er en hensiktsmessig måte for å ekstrahere NPer fra biologiske prøver.

Fra enzymbehandlingen fås det et ekstrakt som er tåkete i utseende som kan tyde på at noe organisk materiale er fortsatt ufordøyd. Denne ufordøyde resten kan komme av fettrester, siden blåskjell inneholder 1,4 g fett og 10,4 g protein per 100 g (Mattilsynet, 2020). Dersom NPer adsorberer seg til fettrester kan NPer potensielt gå tapt hvis fett fester seg til ulikt utstyr under opparbeidingen/analysen, det kan også bidra til å skape en ujevn fordeling av NPene i enzymekstraktet. Dette kan påvirke gjenvinningen og variasjonen til resultatene. Det kunne blitt utforsket om lipaser, enzymer som hydrolyserer fett (Vale et al., 2008), kan påvirke ekstraksjonen av NPer fra matriksen. Pipetteringen av enzymekstraktene virker også å være noe som kan påvirke variasjonen mellom paralleller. Ved pipetteringen av ekstrakter ble det dannet en væskefilm av ekstraktene i pipettetippene som ble igjen etter endt pipettering. Mengden ekstrakt i denne væskefilmen varierte, noe som kan ha bidratt til en høyere variasjon mellom paralleller og lavere gjenvinning av NPer.

5.7.3 Au, ZrO₂ og CeO₂ NPer i blåskjell

For å bli kjent med enzymbehandlingsprosedyren ble metoden testet på Au NPer spiket i blåskjell. Gjenvinningen varierte mellom 90-115% for massekonsentrasjonen, 115-135% for partikkelantallet, 115-237% totalkonsentrasjonen og for 91-97% størrelsen. Stort sett var Au NP-målingene i nærheten av resultatene fått ved en validering som er gjort av andre analytikere/operatører ved HI. Enkelte parametere viste seg å være noe høyere enn de i valideringen. Totalkonsentrasjonen viste seg spesielt å være høyere, dette kommer trolig av bidraget fra blåskjellene i seg selv som hadde en totalkonsentrasjon på 14 – 62 ng/L. Enkelte målinger av blåskjell i valideringen hadde også høyere totalkonsentrasjon målinger (38 ng/L), men disse målingene påvirket ikke den gjennomsnittlige gjenvinningen like mye ettersom disse målingene var i et mindretall. Det er usikkert hvorfor blåskjellene viste så høy totalkonsentrasjon av Au siden det ikke forventes å være mye Au i blåskjell, Au har heller ikke mange interferenser (May & Wiedmeyer, 1998). En mulig forklaring er at instrumentet ble rensset med en høy mengde ionisk Au for å forbedre analyser av Hg i forbindelse med andre analyser som ble gjort på samme instrument. Au-rester i systemet kan ha påvirket analysen av blåskjellene. Imidlertid virket ikke instrumentblankene i analysene og valideringen til å være påvirket, det er dermed usikkert hva som kan ha vært grunnen til de høye målingene. Størrelsesfordelingen til NPene spiket i blåskjellmatriks før og etter enzymbehandlingen viste tilsvarende størrelser, dette indikerer at NPene ikke ble forandret av enzymene når enzymene var på sitt mest aktive. På en annen side skilte størrelsesfordelingen til Au NPer i Milli-Q[®] vann seg delvis fra de i matriks, dette kan tyde på at matrikseffekter kan ha påvirket resultatene til en viss grad.

Størrelsesfordeling til CeO₂ NPer spiket i blåskjellmatriks viste seg å skille seg fra CeO₂ NPer i Milli-Q[®] vann, hvor de spikete blåskjellprøvene hadde en størrelsesfordeling forskjøvet mot mindre størrelser. Dette kommer trolig av at blåskjellprøvene i seg selv inneholdt NPer av mindre størrelser og/eller partikler med en mindre andel Ce. Disse NPene/partiklene forskyver følgelig størrelsesfordeling til den spikete mengden CeO₂ NPer mot mindre størrelser. NP-prøvene spiket før enzymbehandlingen og etter enzymbehandlingen viste tilsvarende størrelsesfordelinger. Dette indikerer at størrelsen til NPene ikke blir påvirket av steget hvor enzymene er mest aktive. Enzymene antas å være mest aktive i prosedyresteget hvor prøvene blir behandlet med et inkubert ristebord ved 50 °C (Liaset, Nortvedt, Lied, & Espe, 2002). Størrelsesparameterne til prøvene holdt seg relativt stabile med en RSD på <7%. NPene spiket

før og etter enzymbehandling i blåskjellmatriks hadde gjenvinning for partikkelantallet på 112-130% og massekonsentrasjonen på 76-87%. CeO₂ NP gjenvinningsresultatene virket ikke å bli påvirket dersom 100 ng/L ZrO₂ NPer var tilstede i samme blåskjellprøve. Ettersom blåskjellene inneholdt NPer/partikler fra før av utgjorde de også et bidrag på gjenvinning av partikkelantallet (41-65%) og massekonsentrasjonen (12-23%). Blåskjellets bidrag til gjenvinningen ble ikke trukket i fra, ettersom det var en del variasjon i biasen (potensielt grunnet prøveopparbeidingen). Ved å subtrahere vekk biasen ville man derfor ha fått et enda mer usikkert svar.

Når ZrO₂ NPer ble spiket i blåskjellmatriks, uten CeO₂ NPer, viste NPene en tilnærmet lik størrelsesfordeling til ZrO₂ NPer i Milli-Q[®] vann. ZrO₂ NPer spiket i blåskjellprøver sammen med CeO₂ NPer viste en størrelsesfordeling som var forskjøvet mot mindre størrelser. Også for ZrO₂ NPer var størrelsesfordelingen for prøver spiket før og etter enzymbehandling tilnærmet like, noe som indikerer at steget i prosedyren hvor enzymene er mest aktive ikke påvirker NPene sin størrelse. NPene spiket før enzymbehandling i blåskjellmatriks gav en gjenvinning for partikkelantallet på 173% og massekonsentrasjonen på 127%. Når ZrO₂ NPene ble spiket i blåskjellmatriks som inneholdt 100 ng/L CeO₂ NPer, fikk man en lavere gjenvinning på 51-94% for partikkelantallet og 74-105% for massekonsentrasjonen. Blåskjellmatriksen i seg selv utgjorde også et bidrag på gjenvinningen av massekonsentrasjonen (4-7%) og partikkelantallet (10-22%) for de spikete ZrO₂ NPene.

At ZrO₂ NPene spiket i blåskjell (uten CeO₂ NPer) gav en tilsvarende størrelsesfordeling til ZrO₂ NPer i Milli-Q[®] stemmer overens med andres funn, hvor det blir påpekt at ekstraksjon med enzymer ikke virker til å endre størrelsen til NPene (Sung et al., 2018; Vidmar et al., 2018; Zhou et al., 2020). Det er ukjent hvorfor ZrO₂ NPene viste en annen størrelsesfordeling når CeO₂ NPer var også til stede i blåskjellmatriksen. Faktumet at CeO₂ og ZrO₂ NPene hadde tilsvarende størrelsesfordeling uavhengig om de ble spiket før eller etter enzymbehandling indikerer at enzymene ikke endrer på størrelsen til NPene når enzymene er på sitt mest aktive. På en annen side kan enzymene fortsatt potensielt påvirke NPene som er spiket etter varmebehandling i enzymprosedyren, selv om enzymene anses til å være mindre aktive ved dette steget. For å trekke en konklusjon om størrelsen til CeO₂ NPene forblir uendret av enzymbehandling hadde det vært hensiktsmessig med blåskjellprøver med mindre innhold av

NPer/partikler fra før, da disse påvirker størrelsesfordelingen til de spikete NPene. CeO₂ NPene i blåskjell hadde en gjenvinning på over 100% for partikkelantallet, dette kommer sannsynligvis av blåskjellene sitt bidrag på partikkelantallet. Imidlertid ble ikke massekonsentrasjonen like påvirket av blåskjellenes bidrag, hvor gjenvinningen var på 76-87%. Dette kommer trolig av at NPene i blåskjellene var av små størrelser og hadde følgelig en liten masse. Prøvene med bare ZrO₂ spiket i blåskjell hadde gjenvinning på >100% for mange parametere (bl.a. massekonsentrasjon og partikkelantall). Ettersom blåskjelllets bidrag ikke kan forklare den høye gjenvinningen ble dette først mistenkt til å komme av den stabiliserende effekten enzymekstrakt har blitt foreslått til å kunne ha på NPer (Vidmar et al., 2018). På en annen side gav ZrO₂ NPer spiket i samme blåskjellmatriks som CeO₂ NPer en mye lavere gjenvinning. Det er usikkert hva som kan ha gitt den høye variasjonen i gjenvinningen til ZrO₂ NPene. Dersom CeO₂ NPene utgjorde en negativ effekt ovenfor ZrO₂ NPene (f.eks. heteroagglomerering) ville man forventet at CeO₂ NPene ble påvirket også, noe de ikke ble. En annen analyse av ZrO₂ NPer spiket i blåskjell sammen med CeO₂ NPer gav målinger av ZrO₂ som så vidt kunne skilles fra blåskjellblankprøver (vedlegg 3.8). Det ble antatt at disse målingene skyldtes en feil i prøveopparbeidingen (resultatene ble derfor ikke inkludert i kap. 4.5.1), men med de varierende resultatene til ZrO₂ NPene kan det stilles spørsmål om det faktisk ble gjort en feil i opparbeidingen. En videre undersøkelse av ZrO₂ NPene kunne vært hensiktsmessig for å få en bedre forståelse av hva som kan ha gitt den store variasjonen i målingene.

5.7.4 Zirkonium og cerium i blåskjell

I de fire ulike lokasjonene ble det funnet 0,5-2,4 ng/g Ce NPer i blåskjell, mens det ble funnet en totalkonsentrasjon av Ce på 19-54 ng/g. Lokasjon D virket til å ha høyest massekonsentrasjon av NPer, B og C hadde tilsvarende verdier, mens plass A hadde lavest massekonsentrasjon. Av plass A, B og C var det bare plass A som hadde signifikant ulik massekonsentrasjon. Plass D og C hadde høyest totalkonsentrasjon fulgt av B, og A til sist. For plass A, B og C var totalkonsentrasjonene signifikant ulike fra hverandre. NP innholdet hos alle plassene var over LOQ, men for totalkonsentrasjonen var bare plass C og D over LOQ, mens alle var over LOD. Lokasjon D ble ikke inkludert i enveis ANOVA-testen for Ce ettersom kravet til normalitet og homogen varians ikke var oppfylt, selv etter log transformering. Et alternativ kunne vært å benytte en ikke-parametrisk ANOVA i stedet for, men dette ble ikke

benyttet ettersom ikke-parametriske tester ikke er gunstig for å finne signifikante forskjeller når antallet prøver er lite (Motulsky, u.å.) Det ble derfor besluttet å gjøre en enveis ANOVA på A, B og C, men uten D. Lokasjon D viste en generelt høy variasjon og den høye variasjonen til totalkonsentrasjonen skilte seg spesielt fra de andre lokasjonene. Dette kan være relatert til hvordan prøvene til lokasjon D ble opparbeidet. I stedet for å lage en felles samleprøve for hele partiet av blåskjell, ble partiet av skjell delt opp i fire ulike grupper av skjell som ble homogenisert til fire separate homogenater. De ulike homogenatene av skjell viste ulike målinger for Ce, noe som resulterer i en høy variasjon når man regner et gjennomsnitt på tvers av de ulike homogenatene. At homogenatene viste forskjellige innhold av Ce kan potensielt komme av biologiske variasjoner hos skjellene i de ulike homogenatene.

Resultantene for Ce i blåskjell kan indikere at det kan være geografiske forskjeller i forhold til hvor mye Ce skjellene har blitt eksponert for og tatt opp fra miljøet. Svakheter i undersøkelsen er at det ble målt et relativt lite antall steder og kun en samleprøve fra hvert sted, med unntak av lokasjon D. For å få et mer entydig svar om det er geografiske variasjon eller biologisk variasjon kunne det vært hensiktsmessig med en større undersøkelse som inkluderte et større antall samleprøver fra samme sted, samt flere lokasjoner, slik at man får undersøkt både geografisk variasjon og biologisk variasjon innad et geografisk område. Som nevnt i kap. 2.3.2 har filterspisende skjellarter vist seg til å kunne ta opp NPer (Conway et al., 2014; Doyle et al., 2016; Tedesco et al., 2010). Det er blitt påpekt at NPer blir tatt opp mer effektivt i agglomerert tilstand (Ward & Kach, 2009), men det har også blitt vist at de kan tas opp via plankton som har NPer adsorbent til seg (Conway et al., 2014). Ce NPene detektert var stort sett <50 nm, dersom man antar at NPene er sfæriske og at de har lik tetthet og grunnstoffsammensetning som Ce-specien. Det er mulig at disse NPene er blitt tatt opp som agglomerater, men at de senere har blitt dissagglomerert i skjellet (Joubert et al., 2013), eller at de er blitt tatt opp via plankton. Ce NPer er blitt rapportert naturlig i kamskjell med en konsentrasjon på opp til 31.7 ng/g (Zhou et al., 2020). Dette kan støtte funnet om at skjell kan ta opp Ce NPer fra miljøet. Imidlertid er den kjemiske sammensetningen, tettheten og formen til de antatte NPene ukjent, man vet heller ikke om de er menneskeskapt eller om de har naturlig opphav. Det kan være at de er i del av heteroagglomerater bestående av andre elementer, eller at de er del av større primærpartikler som inneholder ulike grunnstoff. For å få et bedre bilde av formen og komposisjonen til disse NPene kan komplementære teknikker benyttes f.eks. TEM (Laborda, Bolea, & Jimenez-

Lamana, 2016), men det kan være utfordrende å finne NPer i biologiskmateriale når konsentrasjonen er lav.

For Zr i blåskjell ble det funnet NPer med en massekonsentrasjon på 0,6-2,9 ng/g, mens totalkonsentrasjonen varierte mellom 37-64 ng/g. Massekonsentrasjonen til lokasjon A, B og C viste seg ikke å være signifikant ulike fra hverandre. Totalkonsentrasjonene for A, B og C var derimot signifikant ulike. Lokasjon D ble ikke inkludert i enveis ANOVA-testene av samme grunner som for analysen av Ce i blåskjell. For Zr var alle lokasjonene over LOQ for NP-massekonsentrasjonen, men alle lokasjonene var under LOQ for totalkonsentrasjonen. En analyse av ulike enzymvarianter kunne vært hensiktsmessig for å utforske om enkelte enzymer har lavere bakgrunn av analyttene, dette kunne gi en lavere totalkonsentrasjon LOQ for Ce og Zr. Man kunne også gjort optimalisering av enzymkonsentrasjon mot behandlingstiden for enzymekstraksjonen, for å undersøke om man kan benytte en lavere konsentrasjon av enzymer, da dette også vil trolig gi en lavere LOQ og LOD.

6. Konklusjon

Generelt viste sp-ICP-MS seg å være en lovende teknikk for analyse av NPer, men hvor godt NPene lot seg bestemmes virket b.l.a. å være styrt av NPene sine egenskaper. En annen relevant faktor er hvor godt karakterisert de benyttede NPene var. Med lite definerte størrelsesintervaller og ingen oppgitt usikkerhet på mange av de gitte verdiene til NPene, er det vanskelig å vite hvilke resultater man kan forvente.

ZnO NPer løste seg opp i konsentrasjonsområde på 100-200 ng/L. CuO NPene på <50 nm dekket et stort størrelsesområde, hvor et fåtall partikler på >300 nm skapte stor variasjon mellom paralleller. Bruk av 0,1% PVP-10, PVP-40, sitronsyre og natriumsitrat ved tillaging av stamsuspensjonen av CuO NPer virket ikke til å gi bedre resultater for NPene. CeO₂ NPer på <50 nm gav lave resultater for partikkelantall, massekonsentrasjon og totalkonsentrasjon. CeO₂ NPene på 30-50 nm ga bedre målinger enn CeO₂ NPene på <50 nm, hvor det ble målt et høyere partikkelantall, massekonsentrasjon og totalkonsentrasjon. Å fortynne CeO₂ 30-50 nm NPer i 2,5% eddiksyre forbedret ikke gjenvinningen av NPene. For ZrO₂ NPene virket det å fortynne NPene i stabilisator (0,1% natriumsitrat) til å gi høyere målinger av partikkelantallet og massekonsentrasjon. Sett bort i fra CuO og ZnO NPene var størrelsesparameterne (gjennomsnitt, median og mest hyppigst størrelse) for resten av NPene i nærheten av den oppgitte størrelsen for NPene.

ZrO₂ NPene spiket i blåskjell viste varierende gjenvinningsresultater. For å finne ut av hva som kan ha resultert i den høye variasjonen hadde en videre undersøkelse vært hensiktsmessig. For CeO₂ NPene på 30-50 nm spiket i blåskjell ble det oppnådd mer reproducerbare resultater, uavhengig om NPene ble spiket før eller etter enzymbehandlingen. Enkelte parametere ble påvirket av mengden NPer/partikler i skjellene fra før av.

For Ce analysert i blåskjell var det indikasjoner til variasjon mellom de ulike geografiske lokasjonene i mengden Ce NPer/partikler skjellene hadde tatt opp fra miljøet. For Zr analysert i blåskjell var det ikke en like åpenbar variasjon i mengden Zr NPer/partikler i skjellene fra de ulike lokasjonene.

7. Videre arbeid

Videre arbeid som bør gjøres i forlengelsen av denne oppgaven er:

- ZrO₂ NPer spiket i blåskjell bør undersøkes ytterligere for å finne ut hvilke faktorer som kan forklare den store variasjonen i gjenvinningen.
- Mange av NPene bør karakteriseres bedre med elektronmikroskop, spesielt ved bruk av TEM. En bedre karakterisering av enkelte NPer (CuO <50 nm og CeO₂ <50 nm) kunne potensielt gi en bedre forståelse for hvorfor den målte mengden av NPene var lav.
- En analyse av mer veldefinerte NP-standarder av samme grunnstoffsammensetning som de som er benyttet i denne oppgaven hadde vært hensiktsmessig for å se om man oppnår bedre resultater.
- En optimalisering bør gjøres på enzymbehandlingsmetoden for å undersøke om det kan gi en høyere gjenvinning av NPene. Det bør også undersøkes om bruken av lipaser kan gi en bedre fordøyelse av blåskjellmatriks. Ulike varianter av enzymer bør også prøves ut for å se om de kan gi lavere kvantifiseringsgrenser for totalkonsentrasjonen.
- Arbeidet med screening av NPer i blåskjell bør utvides slik at både blåskjell fra flere geografiske lokasjoner og andre NPer med andre grunnstoffsammensetninger blir inkludert.

8. Referanseliste

- Abad-Alvaro, I., Pena-Vazquez, E., Bolea, E., Bermejo-Barrera, P., Castillo, J. R., & Laborda, F. (2016). Evaluation of number concentration quantification by single-particle inductively coupled plasma mass spectrometry: microsecond vs. millisecond dwell times. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 408(19), 5089-5097. doi:10.1007/s00216-016-9515-y
- Agilent Technologies. (2017a). *Agilent 7800/7900 ICP-MS Hardware Maintenance Manual USA*. USA.
- Agilent Technologies. (2017b). *Agilent ICP-MS MassHunter Workstation Single Nanoparticle Application*. USA.
- Auffan, M., Flahaut, E., Thill, A., Mouchet, F., Carrière, M., Gauthier, L., . . . Bottero, J.-Y. (2011). Ecotoxicology: Nanoparticle Reactivity and Living Organisms. In P. Houdy, M. Lahmani, & F. Marano (Eds.), *Nanoethics and Nanotoxicology* (pp. 325-357). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Baeza-Squiban, A., Vranic, S., & Boland, S. (2013). Fate and Health Impact of Inorganic Manufactured Nanoparticles. In R. Brayner, F. Fiévet, & T. Coradin (Eds.), *Nanomaterials: A Danger or a Promise? A Chemical and Biological Perspective* (pp. 245-267). London: Springer London.
- Baker, T. J., Tyler, C. R., & Galloway, T. S. (2014). Impacts of metal and metal oxide nanoparticles on marine organisms. *Environ Pollut*, 186, 257-271. doi:10.1016/j.envpol.2013.11.014
- Bandara, W. R. L. N., de Silva, R. M., de Silva, K. M. N., Dahanayake, D., Gunasekara, S., & Thanabalasingam, K. (2017). Is nano ZrO₂ a better photocatalyst than nano TiO₂ for degradation of plastics? *Rsc Advances*, 7(73), 46155-46163. doi:10.1039/c7ra08324f
- Batley, G. E., Kirby, J. K., & McLaughlin, M. J. (2013). Fate and Risks of Nanomaterials in Aquatic and Terrestrial Environments. *Acc. Chem. Res*, 46(3), 854-862. doi:10.1021/ar2003368
- Bienfait, A. M., Kutti, T., Meier, S., Van der Meeren, T., Asplin, L., Kögel, T., & Wennevik, V. (2020). *HØRINGSUTTALELSE VEDRØRENDE REVIDERING AV TILLATELSEN TIL SYDVARANGER DRIFT AS*. . Bergen, Norge Havforskninginstituttet.
- Bleeker, E., A., J., Evertz, S., Geertsma, R., E., Peijnenburg, W., J., G., M., Westra, J., & Wijnhoven, S., W., P. . (2015). *Assessing health and environmental risks of nanoparticles Current state of affairs in policy, science and areas of application* (2014-0157). Retrieved from BA Bilthoven, The Netherlands: <https://www.rivm.nl/bibliotheek/rapporten/2014-0157.pdf>
- Bøhle, B. (1972). *Blåskjell og blåskjell dyrking* (Red. utg. ed. Vol. 1972:1). Bergen.
- Bootz, A., Vogel, V., Schubert, D., & Kreuter, J. (2004). Comparison of scanning electron microscopy, dynamic light scattering and analytical ultracentrifugation for the sizing of poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles. *Eur J Pharm Biopharm*.
- Brar, S. K., Tyagi, R. D., Cledón, M., Laurion, I., Negandhi, K., Shahare, M. B., . . . Chaabouni, E. (2015). An Overview on Fate, Transport, and Behavior of Nanomaterials in the Environment. In S. K. Brar, T. C. Zhang, M. Verma, R. Y. Surampalli, & R. D. Tyagi (Eds.), *Nanomaterials in the Environment* (pp. 219-248). Reston, UNITED STATES: American Society of Civil Engineers.
- Bruins, M. R., Kapil, S., & Oehme, F. W. (2000). Microbial Resistance to Metals in the Environment. *Ecotoxicol Environ Saf*, 45(3), 198-207. doi:10.1006/eesa.1999.1860
- Buzea, C., Pacheco, I. I., & Robbie, K. (2007). Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. *Biointerphases*, 2(4), 17-71. doi:10.1116/1.2815690
- Cademartiri, L., & Ozin, G. A. (2009). *Concepts of nanochemistry*. Weinheim: Wiley-VCH.

- Canesi, L., Ciacci, C., Fabbri, R., Marcomini, A., Pojana, G., & Gallo, G. (2012). Bivalve molluscs as a unique target group for nanoparticle toxicity. *Mar Environ Res*, 76, 16-21. doi:10.1016/j.marenvres.2011.06.005
- Chin, W. S., Sow, C. H., & Wee, A. T. S. (2010). *Science at the nanoscale : an introductory textbook*. Singapore: Pan Stanford Publishing.
- Christian, P., Von der Kammer, F., Baalousha, M., & Hofmann, T. (2008). Nanoparticles: structure, properties, preparation and behaviour in environmental media. *Ecotoxicology*, 17(5), 326-343. doi:10.1007/s10646-008-0213-1
- Conway, J. R., Hanna, S. K., Lenihan, H. S., & Keller, A. A. (2014). Effects and Implications of Trophic Transfer and Accumulation of CeO₂ Nanoparticles in a Marine Mussel. *Environ. Sci. Technol*, 48(3), 1517-1524. doi:10.1021/es404549u
- Copat, C., Arena, G., Fiore, M., Ledda, C., Fallico, R., Sciacca, S., & Ferrante, M. (2013). Heavy metals concentrations in fish and shellfish from eastern Mediterranean Sea: Consumption advisories. *Food Chem Toxicol*, 53, 33-37. doi:10.1016/j.fct.2012.11.038
- Cubadda, F. (2007). 15.17 - Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometers. In Y. Picó (Ed.), *Food toxicants analysis : techniques, strategies and developments* (1st ed.). Amsterdam,: Elsevier.
- Cubero-Leon, E., & Ciocan, C. (2013). Mussels as a tool to monitor pollution. In J. Nowak & M. Kozłowski (Eds.), *Mussels : ecology, life habits and control* (pp. 77-99). Hauppauge, N.Y.: Nova Science Publishers, Inc.
- Cullen, M. (2004). *Atomic spectroscopy in elemental analysis*. Oxford: Blackwell Publ.
- Dan, Y. B., Ma, X. M., Zhang, W. L., Liu, K., Stephan, C., & Shi, H. L. (2016). Single particle ICP-MS method development for the determination of plant uptake and accumulation of CeO₂ nanoparticles. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 408(19), 5157-5167. doi:10.1007/s00216-016-9565-1
- De Mello Donega, C. (2014). *Nanoparticles: Workhorses of Nanoscience*. In. doi:10.1007/978-3-662-44823-6
- Donovan, A. R., Adams, C. D., Ma, Y. F., Stephan, C., Eichholz, T., & Shi, H. L. (2016). Detection of zinc oxide and cerium dioxide nanoparticles during drinking water treatment by rapid single particle ICP-MS methods. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 408(19), 5137-5145. doi:10.1007/s00216-016-9432-0
- Doyle, J. J., Ward, J. E., & Mason, R. (2015). An examination of the ingestion, bioaccumulation, and depuration of titanium dioxide nanoparticles by the blue mussel (*Mytilus edulis*) and the eastern oyster (*Crassostrea virginica*). *Mar Environ Res*, 110, 45-52. doi:10.1016/j.marenvres.2015.07.020
- Doyle, J. J., Ward, J. E., & Mason, R. (2016). Exposure of bivalve shellfish to titania nanoparticles under an environmental-spill scenario: Encounter, ingestion and egestion. *J. Mar. Biol. Ass*, 96(1), 137-149. doi:10.1017/S0025315415001174
- Duffus, J. (2002). Heavy metals” a meaningless term? (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, 74, 793-807. doi:10.1351/pac200274050793
- Dumkova, J., Vrlikova, L., Vecera, Z., Putnova, B., Docekal, B., Mikuska, P., . . . Buchtova, M. (2016). Inhaled Cadmium Oxide Nanoparticles: Their in Vivo Fate and Effect on Target Organs. *Int J Mol Sci*, 17(6), 1-20. doi:10.3390/ijms17060874
- El Hadri, H., Petersen, E. J., & Winchester, M. R. (2016). Impact of and correction for instrument sensitivity drift on nanoparticle size measurements by single-particle ICP-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 408(19), 5099-5108. doi:10.1007/s00216-016-9397-z
- European Commission. (2011). Commission Recommendation of 18 October 2011 on the definition of nanomaterial Text with EEA relevance.

- Fabrega, J., Renshaw, J. C., & Lead, J. R. (2009). Interactions of Silver Nanoparticles with *Pseudomonas putida* Biofilms. *Environ. Sci. Technol*, 43(23), 9004-9009. doi:10.1021/es901706j
- Forbes, T. Z. (2015). Occurrence of Nanomaterials in the Environment. In S. K. Brar, T. C. Zhang, M. Verma, R. Y. Surampalli, & R. D. Tyagi (Eds.), *Nanomaterials in the Environment* (pp. 179-218). Reston, UNITED STATES: American Society of Civil Engineers (ASCE).
- Franklin, N. M., Rogers, N. J., Apte, S. C., Batley, G. E., Gadd, G. E., & Casey, P. S. (2007). Comparative Toxicity of Nanoparticulate ZnO, Bulk ZnO, and ZnCl₂ to a Freshwater Microalga (*Pseudokirchneriella subcapitata*): The Importance of Particle Solubility. *Environ. Sci. Technol*, 41(24), 8484-8490. doi:10.1021/es071445r
- Frechette-Viens, L., Hadioui, M., & Wilkinson, K. J. (2019). Quantification of ZnO nanoparticles and other Zn containing colloids in natural waters using a high sensitivity single particle ICP-MS. *Talanta*, 200, 156-162. doi:10.1016/j.talanta.2019.03.041
- Gallochio, F., Biancotto, G., Moressa, A., Pascoli, F., Pretto, T., Toffan, A., . . . Ricci, A. (2020). Bioaccumulation and in vivo formation of titanium dioxide nanoparticles in edible mussels. *Food Chem*, 323, 126841-126841. doi:10.1016/j.foodchem.2020.126841
- Garner, K. L., & Keller, A. A. (2014). Emerging patterns for engineered nanomaterials in the environment: a review of fate and toxicity studies. *Journal of nanoparticle research : an interdisciplinary forum for nanoscale science and technology*, 16(8), 1-28. doi:10.1007/s11051-014-2503-2
- Goesmann, H., & Feldmann, C. (2010). Nanoparticulate Functional Materials. *Angew Chem Int Ed Engl*, 49(8), 1362-1395. doi:10.1002/anie.200903053
- Gosling, E. M. (2015). *Marine bivalve molluscs*. In. doi:10.1002/9781119045212.
- Grødem, A. (2020). *Utvikling av metodikk for screening og bestemmelse av sølvnanopartikler i blåskjell ved bruk av DLS, spICP-MS og EM*. (Masteroppgave), Universitetet i Bergen, Havforskningsinstituttet, Norge.
- Hadioui, M., Merdzan, V., & Wilkinson, K. J. (2015). Detection and Characterization of ZnO Nanoparticles in Surface and Waste Waters Using Single Particle ICPMS. *Environ Sci Technol*, 49(10), 6141-6148. doi:10.1021/acs.est.5b00681
- Handy, R. D., von der Kammer, F., Lead, J. R., Hassellöv, M., Owen, R., & Crane, M. (2008). The ecotoxicology and chemistry of manufactured nanoparticles. *Ecotoxicology*, 17(4), 287-314. doi:10.1007/s10646-008-0199-8
- Hartmann, N. I. B., Skjolding, L. M., Hansen, S. F., Baun, A., Kjølholt, J., & Gottschalk, F. (2014). *Environmental fate and behaviour of nanomaterials: New knowledge on important transformation processes*. (1594, 2014). Retrieved from <https://orbit.dtu.dk/en/publications/environmental-fate-and-behaviour-of-nanomaterials-new-knowledge-o>
- Havforskningsinstituttet. (2019). *Instruks for opparbeiding av prøver ved prøvemottak, Nordnesboder 3*. Bergen, Norge Havforskningsinstituttet.
- Hibbert, D. B., & Gooding, J. J. (2020). *Data analysis for chemistry : an introductory guide for students and laboratory scientists*. In. doi:DOI:10.1093/oso/9780195162103.001.0001
- Hillyer, J. F., & Albrecht, R. M. (2001). Gastrointestinal persorption and tissue distribution of differently sized colloidal gold nanoparticles. *J Pharm Sci*, 90(12), 1927-1936. doi:10.1002/jps.1143
- Horie, M., & Fujita, K. (2011). Toxicity of Metal Oxides Nanoparticles. 5, 145-178. doi:10.1016/B978-0-444-53864-2.00004-9
- Hornyak, G. L., Tibbals, H. F., Dutta, J., & Moore, J. J. (2009). *Introduction to nanoscience & nanotechnology*. Boca Raton, Fla: CRC Press.

- Houdy, P., Lahmani, M., & Marano, F. (2011). *Nanoethics and Nanotoxicology*. Berlin, Heidelberg: Berlin, Heidelberg: Springer.
- Hu, W., Culloty, S., Darmody, G., Lynch, S., Davenport, J., Ramirez-Garcia, S., . . . Sheehan, D. (2014). Toxicity of copper oxide nanoparticles in the blue mussel, *Mytilus edulis*: A redox proteomic investigation. *Chemosphere*, *108*, 289-299. doi:10.1016/j.chemosphere.2014.01.054
- Hull, M. S., Vikesland, P. J., & Schultz, I. R. (2013). Uptake and retention of metallic nanoparticles in the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*). *Aquat Toxicol*, *140-141*, 89-97. doi:10.1016/j.aquatox.2013.05.005
- Jain, K. K. (2012). Nanotoxicology. In (2nd ed. 2012 ed., pp. 455-475). Totowa, NJ: Totowa, NJ: Humana Press.
- Jimenez-Lamana, J., Wojcieszek, J., Jakubiak, M., Asztemborska, M., & Szpunar, J. (2016). Single particle ICP-MS characterization of platinum nanoparticles uptake and bioaccumulation by *Lepidium sativum* and *Sinapis alba* plants. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, *31*(11), 2321-2329. doi:10.1039/c6ja00201c
- Johal, M. S., & Johnson, L. E. (2018). *Understanding nanomaterials* (Second edition. ed.). Boca Raton, Florida: CRC Press.
- Joubert, Y., Pan, J.-F., Buffet, P.-E., Pilet, P., Gilliland, D., Valsami-Jones, E., . . . Amiard-Triquet, C. (2013). Subcellular localization of gold nanoparticles in the estuarine bivalve *Scrobicularia plana* after exposure through the water. *Gold bulletin (World Gold Council)*, *46*(1), 47-56. doi:10.1007/s13404-013-0080-2
- Ju-Nam, Y., & Lead, J. R. (2008). Manufactured nanoparticles: An overview of their chemistry, interactions and potential environmental implications. *Sci Total Environ*, *400*(1), 396-414. doi:10.1016/j.scitotenv.2008.06.042
- Kabata-Pendias, A., & Szteke, B. (2015). *Trace elements in abiotic and biotic environments*. In. doi:10.1201/b18198
- Karlsson, H. L., Cronholm, P., Gustafsson, J., & Möller, L. (2008). Copper Oxide Nanoparticles Are Highly Toxic: A Comparison between Metal Oxide Nanoparticles and Carbon Nanotubes. *Chem. Res. Toxicol*, *21*(9), 1726-1732. doi:10.1021/tx800064j
- Keller, A. A., Huang, Y. X., & Nelson, J. (2018). Detection of nanoparticles in edible plant tissues exposed to nano-copper using single-particle ICP-MS. *Journal of Nanoparticle Research*, *20*(4). doi:10.1007/s11051-018-4192-8
- Keller, A. A., McFerran, S., Lazareva, A., & Suh, S. (2013). Global life cycle releases of engineered nanomaterials. *Journal of nanoparticle research : an interdisciplinary forum for nanoscale science and technology*, *15*(6), 1-17. doi:10.1007/s11051-013-1692-4
- Kollander, B., Kollander, B., Widemo, F., Widemo, F., Ågren, E., Ågren, E., . . . Loeschner, K. (2017). Detection of lead nanoparticles in game meat by single particle ICP-MS following use of lead-containing bullets. *Anal Bioanal Chem*, *409*(7), 1877-1885. doi:10.1007/s00216-016-0132-6
- Kontogeorgis, G. M., & Kiil, S. (2016). *Introduction to Applied Colloid and Surface Chemistry*. Chicester: Chicester: John Wiley & Sons, Incorporated.
- Kreyling, W. G., Semmler-Behnke, M., Seitz, J., Scymczak, W., Wenk, A., Mayer, P., . . . Oberdörster, G. (2009). Size dependence of the translocation of inhaled iridium and carbon nanoparticle aggregates from the lung of rats to the blood and secondary target organs. *Inhal Toxicol*, *21*(sup1), 55-60. doi:10.1080/08958370902942517
- Kulkarni, S. K. (2015). *Nanotechnology : principles and practices*. In. doi:10.1007/978-3-319-09171-6
- Kumar, N., & Kumbhat, S. (2016). *Essentials in nanoscience and nanotechnology*. In. doi:10.1002/9781119096122

- L'Azou, B., & Marano, F. (2011). Nanoparticle Toxicity Mechanisms: Oxidative Stress and Inflammation. In P. Houdy, M. Lahmani, & F. Marano (Eds.), *Nanoethics and Nanotoxicology* (pp. 87-109). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Labille, J., & Bottero, J.-Y. (2011). Fate of Nanoparticles in Aqueous Media. In P. Houdy, M. Lahmani, & F. Marano (Eds.), *Nanoethics and Nanotoxicology* (pp. 291-324). Berlin, Heidelberg: Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Laborda, F., Bolea, E., Cepriá, G., Gómez, M. T., Jiménez, M. S., Pérez-Arantegui, J., & Castillo, J. R. (2016). Detection, characterization and quantification of inorganic engineered nanomaterials: A review of techniques and methodological approaches for the analysis of complex samples. *Anal Chim Acta*, *904*, 10-32. doi:10.1016/j.aca.2015.11.008
- Laborda, F., Bolea, E., & Jimenez-Lamana, J. (2016). Single particle inductively coupled plasma mass spectrometry for the analysis of inorganic engineered nanoparticles in environmental samples. *Trends in Environmental Analytical Chemistry*, *9*, 15-23. doi:10.1016/j.teac.2016.02.001
- Laborda, F., Bolea, E., & Jiménez-Lamana, J. (2014). Single particle inductively coupled plasma mass spectrometry: a powerful tool for nanoanalysis. *Analytical Chemistry*, *86*(5), 2270. doi:10.1021/ac402980q
- Laborda, F., Jimenez-lamana, J., Bolea, E., & Castillo, J. R. (2013). Critical considerations for the determination of nanoparticle number concentrations, size and number size distributions by single particle ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, *28*(8), 1220-1232. doi:10.1039/c3ja50100k
- Lead, J. R., Batley, G. E., Alvarez, P. J. J., Croteau, M.-N., Handy, R. D., McLaughlin, M. J., . . . Schirmer, K. (2018). Nanomaterials in the environment: Behavior, fate, bioavailability, and effects-An updated review. *Environ Toxicol Chem*, *37*(8), 2029-2063. doi:10.1002/etc.4147
- Lee, W. W., & Chan, W. T. (2015). Calibration of single-particle inductively coupled plasma-mass spectrometry (SP-ICP-MS). *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, *30*(6), 1245-1254. doi:10.1039/c4ja00408f
- Li, M., Lin, D., & Zhu, L. (2013). Effects of water chemistry on the dissolution of ZnO nanoparticles and their toxicity to *Escherichia coli*. *Environ Pollut*, *173*, 97-102. doi:10.1016/j.envpol.2012.10.026
- Li, W.-M., & Wang, W.-X. (2013). Distinct biokinetic behavior of ZnO nanoparticles in *Daphnia magna* quantified by synthesizing ⁶⁵Zn tracer. *Water Res*, *47*(2), 895-902. doi:10.1016/j.watres.2012.11.018
- Liaset, B., Nortvedt, R., Lied, E., & Espe, M. (2002). Studies on the nitrogen recovery in enzymic hydrolysis of Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.) frames by Protamex™ protease. *Process biochemistry (1991)*, *37*(11), 1263-1269. doi:10.1016/S0032-9592(02)00003-1
- Loeschner, K., Loeschner, K., Brabrand, M. S. J., Brabrand, M. S. J., Sloth, J. J., Sloth, J. J., . . . Larsen, E. H. (2014). Use of alkaline or enzymatic sample pretreatment prior to characterization of gold nanoparticles in animal tissue by single-particle ICPMS. *Anal Bioanal Chem*, *406*(16), 3845-3851. doi:10.1007/s00216-013-7431-y
- Loeschner, K., Navratilova, J., Grombe, R., Linsinger, T. P. J., Købler, C., Mølhav, K., & Larsen, E. H. (2015). In-house validation of a method for determination of silver nanoparticles in chicken meat based on asymmetric flow field-flow fractionation and inductively coupled plasma mass spectrometric detection. *Food Chem*, *181*, 78-84. doi:10.1016/j.foodchem.2015.02.033

- Lopez-Sanz, S., Bernardo, F. J. G., Martin-Doimeadios, R. C. R., & Rios, A. (2019). Analytical metrology for nanomaterials: Present achievements and future challenges. *Analytica Chimica Acta*, *1059*, 1-15. doi:10.1016/j.aca.2019.02.009
- Lowry, G., V., & Casmane, A. (2009). NANOMATERIAL TRANSPORT, TRANSFORMATION, AND FATE IN THE ENVIRONMENT A Risk-Based Perspective on Research Needs In I. Linkov & J. A. Steevens (Eds.), *Nanomaterials : Risks and Benefits* (pp. 125-137). Dordrecht: Springer Netherlands : Imprint: Springer.
- Mason, R. P. (2013). *Trace Metals in Aquatic Systems*. In. doi:10.1002/9781118274576
- Mattilsynet. (2020). Matvaretabellen Blåskjell, rå. Retrieved from <https://www.matvaretabellen.no/blaaskjell-raa-04.053>
- May, T. W., & Wiedmeyer, R. H. (1998). A table of polyatomic interferences in ICP-MS. *Atomic Spectroscopy*, *19*(5), 150-155.
- McIntyre, R. A. (2012). Common nano-materials and their use in real world applications. *Sci Prog*, *95*(1), 1-22. doi:10.3184/003685012X13294715456431
- Meermann, B., & Nischwitz, V. (2018). ICP-MS for the analysis at the nanoscale a tutorial review. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, *33*(9), 1432-1468. doi:10.1039/c8ja00037a
- Miller, R. J., Lenihan, H. S., Muller, E. B., Tseng, N., Hanna, S. K., & Keller, A. A. (2010). Impacts of Metal Oxide Nanoparticles on Marine Phytoplankton. *Environ. Sci. Technol*, *44*(19), 7329-7334. doi:10.1021/es100247x
- Mohammed, A. S., Kapri, A., & Goel, R. (2011). Heavy Metal Pollution: Source, Impact, and Remedies. In M. S. Khan, A. Zaidi, R. Goel, & J. Musarrat (Eds.), *Bio-management of Metal-Contaminated Soils* (pp. 1-28). Dordrecht: Dordrecht: Springer Netherlands.
- Mohd Omar, F., Abdul Aziz, H., & Stoll, S. (2014). Aggregation and disaggregation of ZnO nanoparticles: Influence of pH and adsorption of Suwannee River humic acid. *Sci Total Environ*, *468-469*, 195-201. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.08.044
- Møller Christensen, J., & Christiansen, M. E. (1978). *Muslinger*. Oslo: Cappelen.
- Montaño, M. D., Olesik, J. W., Barber, A. G., Challis, K., & Ranville, J. F. (2016). Single Particle ICP-MS: Advances toward routine analysis of nanomaterials. *Anal Bioanal Chem*, *408*(19), 5053-5074. doi:10.1007/s00216-016-9676-8
- Montoro Bustos, A. R., Petersen, E. J., Possolo, A., & Winchester, M. R. (2015). Post hoc interlaboratory comparison of single particle ICP-MS size measurements of NIST gold nanoparticle reference materials. *Anal Chem*, *87*(17), 8809-8817. doi:10.1021/acs.analchem.5b01741
- Motulsky, H. J. (u.å.). Advice: When to choose a nonparametric test, GraphPad Statistics Guide. Retrieved from https://www.graphpad.com/guides/prism/latest/statistics/when_to_choose_a_nonparametric.htm?q=Advice+When+to+choose+a+nonparametric+test
- Mozhayeva, D., & Engelhard, C. (2020). A critical review of single particle inductively coupled plasma mass spectrometry - A step towards an ideal method for nanomaterial characterization Dedicated to Professor Gary M. Hieftje on the occasion of his retirement from Indiana University. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, *35*(9), 174-1783. doi:10.1039/c9ja00206e
- Mudunkotuwa, I. A., & Grassian, V. H. (2010). Citric Acid Adsorption on TiO₂ Nanoparticles in Aqueous Suspensions at Acidic and Circumneutral pH: Surface Coverage, Surface Speciation, and Its Impact on Nanoparticle–Nanoparticle Interactions. *J. Am. Chem. Soc*, *132*(42), 14986-14994. doi:10.1021/ja106091q
- Mudunkotuwa, I. A., Rupasinghe, T., Wu, C.-M., & Grassian, V. H. (2012). Dissolution of ZnO Nanoparticles at Circumneutral pH: A Study of Size Effects in the Presence and Absence of Citric Acid. *Langmuir*, *28*(1), 396-403. doi:10.1021/la203542x

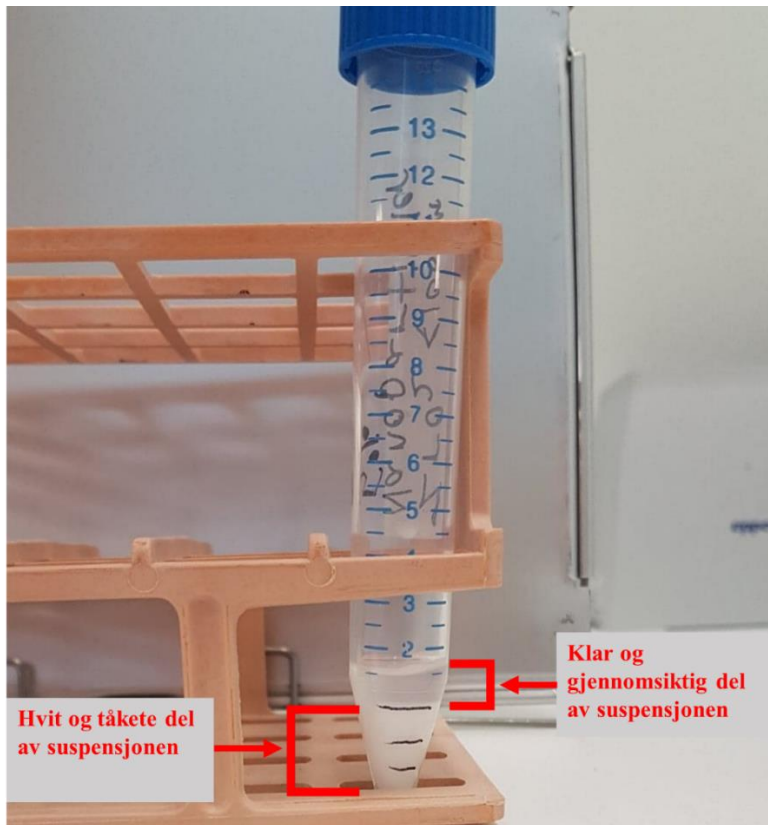
- Murphy, K. E., Liu, J., Montoro Bustos, A. R., Johnson, M. E., & Winchester, M. R. (2016). *Characterization of nanoparticle suspensions using single particle inductively coupled plasma mass spectrometry* (NIST SP 1200-21). Retrieved from <https://www.nist.gov/publications/characterization-nanoparticle-suspensions-using-single-particle-inductively-coupled>
- Nanodatabase, T. (2013). CONSUMER PRODUCTS. Retrieved from <https://nanodb.dk/en/analysis/consumer-products/#chartHashsection>
- Narayanan, R., & El-Sayed, M. A. (2004). Shape-Dependent Catalytic Activity of Platinum Nanoparticles in Colloidal Solution. *Nano Lett*, 4(7), 1343-1348. doi:10.1021/nl0495256
- Nichols, G., Byard, S., Bloxham, M. J., Botterill, J., Dawson, N. J., Dennis, A., . . . Sherwood, J. D. (2002). A Review of the Terms Agglomerate and Aggregate with a Recommendation for Nomenclature Used in Powder and Particle Characterization. *J Pharm Sci*, 91(10), 2103-2109. doi:10.1002/jps.10191
- Nowack, B., & Bucheli, T. D. (2007). Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. *Environ Pollut*, 150(1), 5-22. doi:10.1016/j.envpol.2007.06.006
- Nriagu, J. O., & Pacyna, J. M. (1988). Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals. *Nature*, 333(6169), 134-139. doi:10.1038/333134a0
- Nysæther, L. B. (1984). Undersøkelse av blåskjell. In: Fiskeridirektoratet.
- Olesik, J. W. (2014). 15.17 - Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometers. In H. D. Holland & K. K. Turekian (Eds.), *Treatise on geochemistry* (Second Edition ed., pp. 309-336). Amsterdam, Netherlands ;, Oxford, England ;, Waltham, Massachusetts: Elsevier Ltd.
- Olesik, J. W., & Gray, P. J. (2012). Considerations for measurement of individual nanoparticles or microparticles by ICP-MS: determination of the number of particles and the analyte mass in each particle. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 27(7), 1143-1155. doi:10.1039/c2ja30073g
- Pace, H. E., Rogers, N. J., Jarolimek, C., Coleman, V. A., Gray, E. P., Higgins, C. P., & Ranville, J. F. (2012). Single particle inductively coupled plasma-mass spectrometry: a performance evaluation and method comparison in the determination of nanoparticle size. *Environmental Science & Technology*, 46(22), 12272. doi:10.1021/es301787d
- Pace, H. E., Rogers, N. J., Jarolimek, C., Coleman, V. A., Higgins, C. P., & Ranville, J. F. (2011). Determining Transport Efficiency for the Purpose of Counting and Sizing Nanoparticles via Single Particle Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 83(24), 9361-9369. doi:10.1021/ac201952t
- Peng, C., Shen, C., Zheng, S., Yang, W., Hu, H., Liu, J., & Shi, J. (2017). Transformation of CuO Nanoparticles in the Aquatic Environment: Influence of pH, Electrolytes and Natural Organic Matter. *Nanomaterials (Basel)*, 7(10), 326. doi:10.3390/nano7100326
- Peng, C., Zhang, W., Gao, H., Li, Y., Tong, X., Li, K., . . . Chen, Y. (2017). Behavior and Potential Impacts of Metal-Based Engineered Nanoparticles in Aquatic Environments. *Nanomaterials (Basel)*, 7(1), 21. doi:10.3390/nano7010021
- Peters, R., Herrera-Rivera, Z., Undas, A., Van Der Lee, M., Marvin, H., Bouwmeester, H., & Weigel, S. (2015). Single particle ICP-MS combined with a data evaluation tool as a routine technique for the analysis of nanoparticles in complex matrices. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 30(6), 1274-1285. doi:10.1039/c4ja00357h
- Peters, R., Rivera, Z., Bommel, G., Marvin, H., Weigel, S., & Bouwmeester, H. (2014). Development and validation of single particle ICP-MS for sizing and quantitative determination of nano-silver in chicken meat. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406(16), 3875-3885. doi:10.1007/s00216-013-7571-0

- Peters, R. J. B., van Bommel, G., Milani, N. B. L., den Hertog, G. C. T., Undas, A. K., van der Lee, M., & Bouwmeester, H. (2018). Detection of nanoparticles in Dutch surface waters. *Sci Total Environ*, *621*, 210-218. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.11.238
- Prichard, F. E., & Barwick, V. (2007). *Quality assurance in analytical chemistry*. In Analytical techniques in the sciences. doi:10.1002/9780470517772
- Rainbow, P. S. (2018). *Trace metals in the environment and living organisms : the British isles as a case study*. In. doi:<https://doi.org/10.1017/9781108658423>
- Raza, G., Amjad, M., Kaur, I., & Wen, D. (2016). Stability and Aggregation Kinetics of Titania Nanomaterials under Environmentally Realistic Conditions. *Environ. Sci. Technol*, *50*(16), 8462-8472. doi:10.1021/acs.est.5b05746
- Reed, K., Cormack, A., Kulkarni, A., Mayton, M., Sayle, D., Klaessig, F., & Stadler, B. (2014). Exploring the properties and applications of nanoceria: is there still plenty of room at the bottom? *Environmental science. Nano*, *1*(5), 390-405. doi:10.1039/C4EN00079J
- Reed, R. B., Higgins, C. P., Westerhoff, P., Tadjiki, S., & Ranville, J. F. (2012). Overcoming challenges in analysis of polydisperse metal-containing nanoparticles by single particle inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, *27*(7), 1093-1100. doi:10.1039/c2ja30061c
- Remédios, C., Rosário, F., & Bastos, V. (2012). Environmental Nanoparticles Interactions with Plants: Morphological, Physiological, and Genotoxic Aspects. *Journal of botany*, *2012*, 1-8. doi:10.1155/2012/751686
- Rhodes, M. J. (2008). *Introduction to particle technology*. In. doi:10.1002/9780470727102
- Rocha, T. L., Gomes, T., Sousa, V. S., Mestre, N. C., & Bebianno, M. J. (2015). Ecotoxicological impact of engineered nanomaterials in bivalve molluscs: An overview. *Mar Environ Res*, *111*, 74-88. doi:10.1016/j.marenvres.2015.06.013
- Sannac, S. (2015). Single particle analysis of nanomaterials using the Agilent 7900 ICP-MS. *Application Note, Agilent Technologies*.
- Stankovic, S., Jovic, M., Stankovic, A. R., & Katsikas, L. (2011). Heavy Metals in Seafood Mussels. Risks for Human Health. In E. Lichtfouse, D. Robert, & J. Schwarzbauer (Eds.), *Environmental Chemistry for a Sustainable World: Volume 1: Nanotechnology and Health Risk* (pp. 311-373). Dordrecht: Dordrecht: Springer Netherlands.
- Sung, H. K., Jo, E., Kim, E., Yoo, S. K., Lee, J. W., Kim, P. J., . . . Eom, I. C. (2018). Analysis of gold and silver nanoparticles internalized by zebrafish (*Danio rerio*) using single particle-inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Chemosphere*, *209*, 815-822. doi:10.1016/j.chemosphere.2018.06.149
- Taboada-Lopez, M. V., Alonso-Seijo, N., Herbello-Hermelo, P., Bermejo-Barrera, P., & Moreda-Pineiro, A. (2019). Determination and characterization of silver nanoparticles in bivalve molluscs by ultrasound assisted enzymatic hydrolysis and sp-ICP-MS. *Microchemical Journal*, *148*, 652-660. doi:10.1016/j.microc.2019.05.023
- Taboada-Lopez, M. V., Herbello-Hermelo, P., Dominguez-Gonzalez, R., Bermejo-Barrera, P., & Moreda-Pineiro, A. (2019). Enzymatic hydrolysis as a sample pre-treatment for titanium dioxide nanoparticles assessment in surimi (crab sticks) by single particle ICP-MS. *Talanta*, *195*, 23-32. doi:10.1016/j.talanta.2018.11.023
- Tancredi, P., Veiga, L. S., Garate, O., & Ybarra, G. (2019). Magnetophoretic mobility of iron oxide nanoparticles stabilized by small carboxylate ligands. *Colloids and surfaces. A, Physicochemical and engineering aspects*, *579*, 123664. doi:10.1016/j.colsurfa.2019.123664
- Taylor, H. E. (2001). *Inductively coupled plasma-mass spectrometry : practices and techniques*. San Diego, Calif: Academic Press.

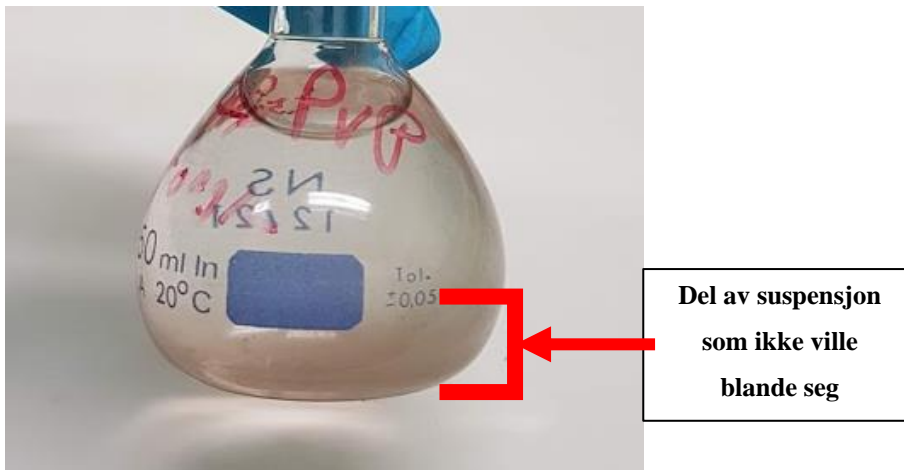
- Tedesco, S., Doyle, H., Blasco, J., Redmond, G., & Sheehan, D. (2010). Oxidative stress and toxicity of gold nanoparticles in *Mytilus edulis*. *Aquat Toxicol*, *100*(2), 178-186. doi:10.1016/j.aquatox.2010.03.001
- Thomas, R. (2013). *Practical Guide to ICP-MS*. In *A Tutorial for Beginners, Third Edition*. doi:<https://doi.org/10.1201/b14923>
- Tombácz, E., Tóth, I. Y., Nesztor, D., Illés, E., Hajdú, A., Szekeres, M., & L.Vékás. (2013). Adsorption of organic acids on magnetite nanoparticles, pH-dependent colloidal stability and salt tolerance. *Colloids and surfaces. A, Physicochemical and engineering aspects*, *435*, 91-96. doi:10.1016/j.colsurfa.2013.01.023
- Valdersnes, S., Bienfait, A. M., Solli, B., & Bruvoll, A. S. (2020). *600 - Kalibrering av instrument for nanopartikkelbestemmelse og bestemmelse av gullnanopartikler i blåskjell med ICPMS*. Bergen, Norge Havforskningsinstituttet.
- Vale, G., Rial-Otero, R., Mota, A., Fonseca, L., & Capelo, J. L. (2008). Ultrasonic-assisted enzymatic digestion (USAED) for total elemental determination and elemental speciation: A tutorial. *Talanta*, *75*(4), 872-884. doi:10.1016/j.talanta.2007.12.037
- Vidmar, J., Buerki-Thurnherr, T., & Loeschner, K. (2018). Comparison of the suitability of alkaline or enzymatic sample pre-treatment for characterization of silver nanoparticles in human tissue by single particle ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, *33*(5), 752-761. doi:10.1039/c7ja00402h
- Walbruck, K., Kuellmer, F., Witzleben, S., & Guenther, K. (2019). Synthesis and Characterization of PVP-Stabilized Palladium Nanoparticles by XRD, SAXS, SP-ICP-MS, and SEM. *Journal of Nanomaterials*. doi:10.1155/2019/4758108
- Wang, N., Tong, T., Xie, M., & Gaillard, J.-F. (2016). Lifetime and dissolution kinetics of zinc oxide nanoparticles in aqueous media. *Nanotechnology*, *27*(32), 324001. doi:10.1088/0957-4484/27/32/324001
- Wang, Z., Yin, L., Zhao, J., & Xing, B. (2016). Trophic transfer and accumulation of TiO₂ nanoparticles from clamworm (*Perinereis aibuhitensis*) to juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*) along a marine benthic food chain. *Water Res*, *95*, 250-259. doi:10.1016/j.watres.2016.03.027
- Ward, J. E., & Kach, D. J. (2009). Marine aggregates facilitate ingestion of nanoparticles by suspension-feeding bivalves. *Mar Environ Res*, *68*(3), 137-142. doi:10.1016/j.marenvres.2009.05.002
- Weigel, S., Peters, R., Loeschner, K., Grombe, R., & Linsinger, T. P. J. (2017). Results of an interlaboratory method performance study for the size determination and quantification of silver nanoparticles in chicken meat by single-particle inductively coupled plasma mass spectrometry (sp-ICP-MS). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *409*(20), 4839-4848. doi:10.1007/s00216-017-0427-2
- Wiesner, M. R., Lowry, G. V., Alvarez, P., Dionysiou, D., & Biswas, P. (2006). Assessing the Risks of Manufactured Nanomaterials. *Environ. Sci. Technol*, *40*(14), 4336-4345. doi:10.1021/es062726m
- Wiley, M., & Wiley, J. F. (2020). *Analysis of Variance*. Berkeley, CA: Apress.
- Wojcieszek, J., Jimenez-Lamana, J., Bierla, K., Ruzik, L., Asztemborska, M., Jarosz, M., & Szpunar, J. (2019). Uptake, translocation, size characterization and localization of cerium oxide nanoparticles in radish (*Raphanus sativus* L.). *Science of the Total Environment*, *683*, 284-292. doi:10.1016/j.scitotenv.2019.05.265
- Xia, G., Jiang, H., Liu, R., & Zhai, Y. (2014). Effects of surfactant on the stability and thermal conductivity of Al₂O₃/de-ionized water nanofluids. *International journal of thermal sciences*, *84*(84), 118-124. doi:10.1016/j.ijthermalsci.2014.05.004
- Yan, B., Zhou, H., & Gardea-Torresdey, J. L. (2017). *Bioactivity of Engineered Nanoparticles*. In *Nanomedicine and Nanotoxicology*. doi:10.1007/978-981-10-5864-6.

- Yu, L. E., Lanry Yung, L.-Y., Ong, C.-N., Tan, Y.-L., Suresh Balasubramaniam, K., Hartono, D., . . . Ong, W.-Y. (2009). Translocation and effects of gold nanoparticles after inhalation exposure in rats. *Nanotoxicology*, *1*(3), 235-242. doi:10.1080/17435390701763108
- Zhang, W., Pu, Z., Du, S., Chen, Y., & Jiang, L. (2016). Fate of engineered cerium oxide nanoparticles in an aquatic environment and their toxicity toward 14 ciliated protist species. *Environ Pollut*, *212*, 584-591. doi:10.1016/j.envpol.2016.03.011
- Zhou, Q., Liu, L., Liu, N., He, B., Hu, L., & Wang, L. (2020). Determination and characterization of metal nanoparticles in clams and oysters. *Ecotoxicol Environ Saf*, *198*, 110670-110670. doi:10.1016/j.ecoenv.2020.110670

9. Vedlegg



Vedlegg 1.1 alikvot av <100 nm ZrO_2 NP-leverandørsuspensjon 5% (vekt %). Bildet viser at en tydelig fase separasjon oppsto etter omtrent 5 minutter.



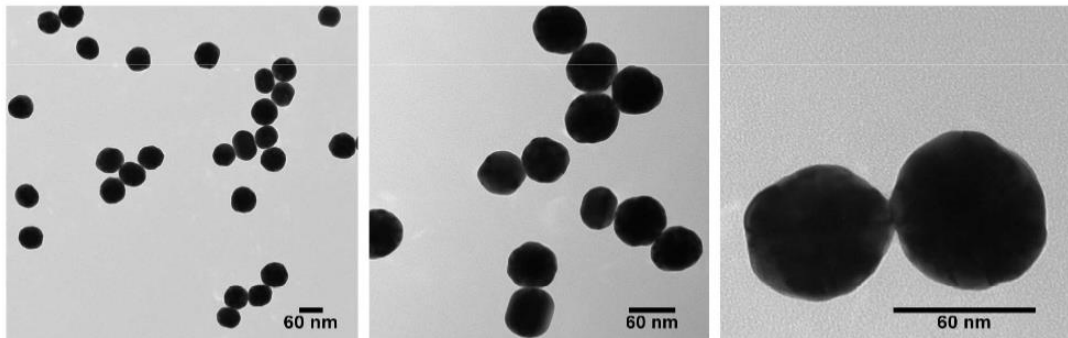
Vedlegg 1.2 50 mg/L <50 nm CuO NP-stamsuspensjon stabilisert med PVP-40. Bildet viser at en fase separasjon oppsto over lengre lagringstid (>25 dager). Fase separasjonen gikk ikke vekk med hard risting.

60 nm Gold Nanospheres, Citrate, NanoXact™

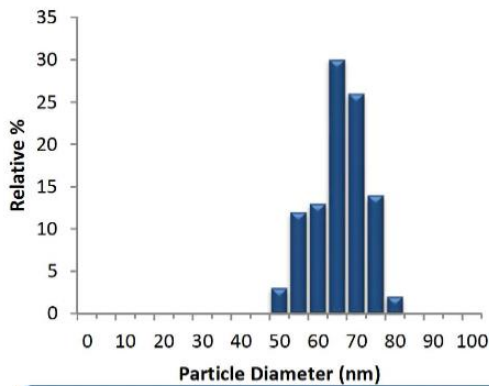
Product Number: AUCN60

Lot Number: TJC0086

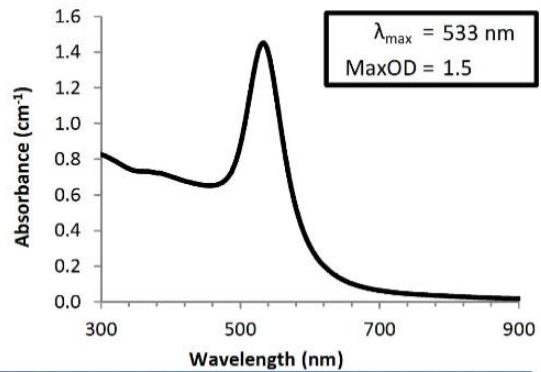
Diameter ± Std.Dev (TEM):	63 ± 7 nm	Hydrodynamic Diameter:	74 nm
Coefficient of Variation:	10.7 %	Zeta Potential:	-55 mV
Surface Area (Calc'd):	4.8 m ² /g	pH of Solution:	7.6
Mass Concentration (Au):	0.054 mg/mL	Gold Purity:	99.99 %
Particle Concentration (Calc'd):	2.1E+10 particles/mL	Particle Surface:	Bare (Citrate)
Molar Particle Concentration:	3.5E-11 particle # (mol/L)	Solvent:	Aqueous 2mM Sodium Citrate



Size Distribution



Optical Properties



Characterization Instrumentation

Diameter and Size Statistics:	JEOL 1010 Transmission Electron Microscope; ImageJ
Mass Concentration:	Thermo Fisher X Series 2 ICP-MS
Spectral Properties:	Agilent 8453 UV-Visible Spectrometer
Hydrodynamic Diameter/Zeta Potential:	Malvern Zetasizer Nano ZS-(>10 nm Products Only)
Endotoxin:	Pyros Kinetix -Turbidimetric Assay-(BioPure Only)
pH:	Horiba - Laqua Twin pH Meter

Recommended storage: 2-8 °C. DO NOT FREEZE.

Certificate of Analysis

Product Name:

Cerium(IV) oxide – nanopowder, <50 nm particle size (BET), 99.95% trace rare earth metals basis

Product Number: 700290
Batch Number: MKCG5141
Brand: ALDRICH
CAS Number: 1306-38-3
Formula: CeO₂
Formula Weight: 172.11 g/mol
Quality Release Date: 11 JUL 2018



Test	Specification	Result
Appearance (Color)	White to Yellow	Light Yellow
Appearance (Form)	Powder	Powder
X-Ray Diffraction	Conforms to Structure	Conforms
Particle Size	Confirmed	Confirmed
< 50 nm (BET)		
Purity	Meets Requirements	Meets Requirements
99.95% Based On Rare Earth Analysis		
Trace Rare Earth Analysis	≤ 550.0 ppm	160.0 ppm
Aluminum (Al)		75.0 ppm
Boron (B)		2.1 ppm
Barium (Ba)		1.8 ppm
Calcium (Ca)		40.0 ppm
Chromium (Cr)		2.9 ppm
Copper (Cu)		0.2 ppm
Iron (Fe)		45.0 ppm
Potassium (K)		2.1 ppm
Magnesium (Mg)		1.8 ppm
Manganese (Mn)		0.4 ppm
Sodium (Na)		340.0 ppm
Nickel (Ni)		0.2 ppm
Lead (Pb)		0.9 ppm
Strontium (Sr)		0.7 ppm
Titanium (Ti)		0.4 ppm
Zinc (Zn)		39.0 ppm
Zirconium (Zr)		0.2 ppm

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

Version Number: 1

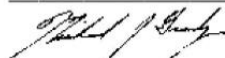
Page 1 of 2

Vedlegg 2.2 analysesertifikat CeO₂ NP-pulver <50 nm (del 1 av 2)

Certificate of Analysis

Product Number: 700290
Batch Number: MKCG5141

Test	Specification	Result
Erbium (Er)		0.3 ppm
Europium (Eu)		0.2 ppm
Holmium (Ho)		0.1 ppm
Lanthanum (La)		73.0 ppm
Lutetium (Lu)		0.3 ppm
Neodymium (Nd)		17.0 ppm
Praseodymium (Pr)		65.0 ppm
Samarium (Sm)		0.3 ppm
Terbium (Tb)		0.3 ppm
Yttrium (Y)		3.5 ppm



Michael Grady, Manager
Quality Control
Milwaukee, WI US

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

Version Number: 1

Page 2 of 2

Vedlegg 2.2 analysesertifikat CeO₂ NP-pulver <50 nm (del 2 av 2)

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA

Website: www.sigmaaldrich.com

Email USA: techserv@sial.com

Outside USA: eurtechserv@sial.com

Certificate of Analysis

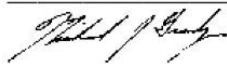
Product Name:

Cerium(IV) oxide, dispersion – 20 wt. % colloidal dispersion in 2.5% acetic acid, 30–50 nm avg. part. size

Product Number: 289744
Batch Number: MKCM3196
Brand: ALDRICH
MDL Number: MFCD00010933
Formula: CeO₂
Formula Weight: 172.11 g/mol
Quality Release Date: 14 APR 2020

CeO₂

Test	Specification	Result
Appearance (Color)	White to Yellow	Off-White
Appearance (Form)	Liquid	Liquid
X-Ray Diffraction	Conforms to Structure	Conforms
Residue on Evaporation	18.0 - 22.0 %	18.9 %
Particle Size	Confirmed	Confirmed
30-50 nm avg. part. size		
Titration with NaOH		2.5 %
Approximately 2.5% Acetic Acid		



Michael Grady, Manager
Quality Control
Milwaukee, WI US

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

Version Number: 1

Page 1 of 1

Vedlegg 2.3 analysesertifikat CeO₂ NP-leverandørsuspensjon 30-50 nm 20% (vekt %) i 2,5% eddiksyre.

Certificate of Analysis

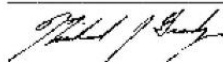
Product Name:

Zinc oxide, dispersion - nanoparticles, <100 nm particle size (TEM), ≤40 nm avg. part. size (APS), 20 wt. % in H₂O

Product Number: 721077
Batch Number: MKCG4586
Brand: ALDRICH
CAS Number: 1314-13-2
Quality Release Date: 15 MAY 2018

ZnO

Test	Specification	Result
Appearance (Color)	Off-White to Tan	Off-White
Appearance (Form)	Conforms	Conforms
Dispersion		
ICP Major Analysis	Confirmed	Confirmed
Confirms Zinc Component		
Size	< 100 nm	< 40 nm
pH	6.0 - 9.0	8.9
Concentration	18 - 22 % wt	21 % wt
% ZnO		



Michael Grady, Manager
 Quality Control
 Milwaukee, WI US

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA

Website: www.sigmaaldrich.com

Email USA: techserv@sial.com

Outside USA: eurtechserv@sial.com

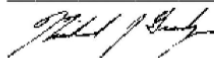
Certificate of Analysis

Product Name:

Zirconium(IV) oxide - nanoparticles, dispersion, <100 nm particle size (BET), 5 wt. % in H₂O

Product Number: 643122
Batch Number: MKBZ0104V
Brand: ALDRICH
CAS Number: 1314-23-4
MDL Number: MFCD00011310
Formula: O₂Zr
Formula Weight: 123.22 g/mol
Quality Release Date: 11 APR 2016

Test	Specification	Result
Appearance (Color)	White to Off-White	White
Appearance (Form)	Liquid	Liquid
ICP Major Analysis	Confirmed	Confirmed
Confirms Zirconium Component		
Loading, Molecular	4 - 6 % wt	5 % wt
pH	5 - 6	6
Surface Area	≥ 10.2 m ² /g	55.4 m ² /g
Size	≤ 100 nm	18 nm
Average Particle Size (BET)		



Michael Grady, Manager
Quality Control
Milwaukee, WI US

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

Version Number: 1

Page 1 of 1

Vedlegg 2.5 analysesertifikat ZrO₂ NP-leverandørsuspensjon <100 nm 5% (vekt %)

Certificate of Analysis

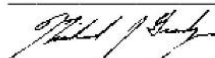
Product Name:

Copper(II) oxide – nanopowder, <50 nm particle size (TEM)

Product Number: 544868
Batch Number: MKCJ5626
Brand: ALDRICH
CAS Number: 1317-38-0
MDL Number: MFCD00010979
Formula: CuO
Formula Weight: 79.55 g/mol
Quality Release Date: 25 FEB 2019

CuO

Test	Specification	Result
Appearance (Color)	Black	Black
Appearance (Form)	Powder	Powder
Complexometric EDTA % Copper	77.0 - 82.6 %	78.8 %
X-Ray Diffraction Size	Conforms to Structure < 50 nm	Conforms 40 nm
Average Particle Size (by TEM)		



Michael Grady, Manager
 Quality Control
 Milwaukee, WI US

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

Vedlegg 3.1 resultater for NanoComposix og PerkinElmer Au NPer 100 ng/L 60 nm. Størrelsebestemmelsesgrensen er satt som nedre grense eller intervall.

Prøvetype	TE	Antall partikler	Partikkelantall-konsentrasjon (partikler/L)	Masse-konsentrasjon (ng/L)	Total-konsentrasjon (ppb)	Snitt størrelse (nm)	Median størrelse (nm)	Hyppigst størrelse (nm)	Grunnlinje (CPS)	Størrelsebestemmelsesgrense (CPS)
PerkinElmer Au NPer nedre grense	0,055	829	2,2E+07	47	0,052	59	59	60	0	2,2E+06
PerkinElmer Au NPer nedre grense	0,060	764	1,8E+07	40	0,049	59	59	60	0	1,8E+06
PerkinElmer Au NPer nedre grense	0,054	882	2,4E+07	52	0,060	60	59	60	0	2,0E+06
PerkinElmer Au NPer nedre grense	0,056	789	2,1E+07	45	0,048	59	58	58	0	2,5E+06
PerkinElmer Au NPer nedre grense	0,058	775	1,9E+07	43	0,047	60	59	60	0	1,7E+06
PerkinElmer Au NPer nedre grense	0,055	764	2,0E+07	44	0,047	59	59	60	0	2,0E+06
PerkinElmer Au NPer nedre grense	0,061	875	2,1E+07	46	0,048	59	58	58	0	2,0E+06
PerkinElmer Au NPer intervallgrense	0,060	770	1,9E+07	41	0,052	60	60	60	0	2,2E+06
PerkinElmer Au NPer intervallgrense	0,065	701	1,6E+07	34	0,049	60	60	62	0	2,5E+06
PerkinElmer Au NPer intervallgrense	0,057	831	2,1E+07	46	0,060	60	60	60	0	2,6E+06
PerkinElmer Au NPer intervallgrense	0,062	714	1,7E+07	36	0,048	60	60	60	0	2,8E+06
PerkinElmer Au NPer intervallgrense	0,062	715	1,7E+07	37	0,047	60	60	62	0	2,4E+06
PerkinElmer Au NPer intervallgrense	0,059	706	1,7E+07	37	0,047	60	60	60	0	2,3E+06
PerkinElmer Au NPer intervallgrense	0,066	806	1,8E+07	39	0,048	60	60	60	0	2,0E+06
NanoComposix Au NPer intervallgrense	0,068	1307	2,8E+07	61	0,068	60	60	62	0	1,3E+06
NanoComposix Au NPer intervallgrense	0,070	1498	3,1E+07	68	0,075	59	60	64	0	9,4E+05
NanoComposix Au NPer intervallgrense	0,067	1331	2,9E+07	62	0,070	59	60	64	0	1,2E+06
NanoComposix Au NPer intervallgrense	0,076	1251	2,4E+07	52	0,060	59	60	64	0	1,8E+06
NanoComposix Au NPer intervallgrense	0,065	1448	3,2E+07	70	0,080	60	60	62	0	2,5E+06
NanoComposix Au NPer intervallgrense	0,064	1503	3,4E+07	74	0,085	60	60	64	0	2,4E+06
NanoComposix Au NPer intervallgrense	0,071	1522	3,1E+07	68	0,078	60	60	62	0	3,1E+06
NanoComposix Au NPer intervallgrense	0,074	1750	3,4E+07	75	0,088	60	60	62	0	2,3E+06

Vedlegg 3.2 resultater for blåskjellblanker og Au NPer 60 nm (NanoComposix og PerkinElmer) spiket i blåskjell før og etter enzymbehandling.

Prøvetype	TE	Antall partikler	Partikkelantall-konsentrasjon (partikler/L)	Masse-konsentrasjon (ng/L)	Total-konsentrasjon (ppb)	Snitt størrelse (nm)	Median størrelse (nm)	Hyppigst størrelse (nm)	Grunnlinje (CPS)	Størrelsebestemmelsesgrense (CPS)
Blåskjellblank	0,060	48	1,2E+06	0,8	0,062	31	25	24	0	1,4E+05
PerkinElmer Au NPer 100 ng/L	0,060	853	2,1E+07	47	0,052	60	60	60	0	1,4E+05
PerkinElmer Au NPer spiket etter enzymbehandling i blåskjell 100 ng/L	0,060	1148	2,8E+07	54	0,104	56	57	58	0	1,4E+05
PerkinElmer Au NPer spiket før enzymbehandling i blåskjell 50 ng/L	0,060	476	1,2E+07	22	0,065	55	57	58	0	1,4E+05
PerkinElmer Au NPer spiket før enzymbehandling i blåskjell 50 ng/L	0,060	467	1,1E+07	21	0,059	55	57	58	0	1,4E+05
Blåskjellblank	0,067	32	6,9E+05	1,0	0,014	49	53	62	0	1,8E+05
NanoComposix Au NPer 100 ng/L	0,067	1405	3,0E+07	67	0,070	59	60	64	0	1,8E+05
NanoComposix Au NPer spiket før enzymbehandling i blåskjell 100 ng/L	0,067	1620	3,5E+07	60	0,080	55	55	58	0	1,8E+05

Vedlegg 3.3 resultater for ZnO NPer, Milli-Q® vann instrumentblanker og 10 µg/L ionisk Zn.

Prøvetype	TE	Signal (CPS)	Antall partikler	Partikkelantall-konsentrasjon (partikler/L)	Masse-konsentrasjon (ng/L)	Total-konsentrasjon (ppb)	Snitt størrelse (nm)	Median størrelse (nm)	Hyppigst størrelse (nm)	Grunnlinje (CPS)	Størrelsebestemmelsesgrense (CPS)
Ionisk Zn 10 µg/L		1,7E+05				10,2				-	-
Milli-Q® vann		2863				0,173				0	
Milli-Q® vann	0,060	2359	0	0	0	0,143				0	1,3E+05
ZnO ₂ NP 100 ng/L	0,060	2977	2	4,8E+04	0,028	0,180	58	58	64	0	1,1E+05
ZnO ₂ NP 200 ng/L	0,060	4163	0	0	0	0,252				0	1,8E+05
Milli-Q® vann	0,060	720	0	0	0	0,044				0	7,5E+04

Vedlegg 3.4 resultater for CuO NPer i Milli-Q® vann og CuO NPer stabilisert ved stamsuspensjonen med 0,1% PVP-10, PVP-40, natriumsitrat og sitronsyre.

Prøvetype	TE	Antall partikler	Partikkelantall-konsentrasjon (partikler/L)	Masse-konsentrasjon (ng/L)	Total-konsentrasjon (ppb)	Snitt størrelse (nm)	Median størrelse (nm)	Hyppigst størrelse (nm)	Grunnlinje (CPS)	Størrelsebestemmelsesgrense (CPS)
CuO NPer 100 ng/L	0,065	67	1,5E+06	12	0,045	101	78	120	0	9,5E+04
CuO NPer 100 ng/L	0,065	80	1,8E+06	13	0,045	93	80	36	0	9,5E+04
CuO NPer 100 ng/L	0,057	90	2,3E+06	42	0,109	110	99	36	0	1,3E+05
CuO NPer 100 ng/L	0,057	80	2,0E+06	16	0,076	97	85	34	0	1,3E+05
CuO NPer 200 ng/L	0,057	147	3,7E+06	43	0,092	108	92	34	0	1,3E+05
CuO NPer 200 ng/L	0,057	142	3,6E+06	25	0,066	98	85	42	0	1,3E+05
CuO NPer 500 ng/L	0,057	374	9,5E+06	92	0,133	109	97	36	0	1,3E+05
CuO NPer 500 ng/L	0,057	425	1,1E+07	124	0,164	112	97	36	0	1,3E+05
CuO NPer 100 ng/L	0,062	38	8,9E+05	25	0,057	154	133	102	0	1,1E+05
CuO NPer sitronsyre 100 ng/L	0,062	26	6,1E+05	3,0	0,073	95	97	114	0	1,2E+05
CuO NPer sitronsyre 1 µg/L	0,062	306	7,2E+06	46	0,460	108	91	80	0	1,5E+06
CuO NPer PVP-10.000 100 ng/L	0,062	45	1,1E+06	13	0,053	117	107	40	0	1,2E+05
CuO NPer PVP-10.000 1 µg/L	0,062	318	7,4E+06	133	0,188	130	115	40	0	1,7E+05
CuO NPer PVP-40.000 100 ng/L	0,062	61	1,4E+06	17	0,059	109	83	36	0	1,2E+05
CuO NPer PVP-40.000 1 µg/L	0,062	235	5,5E+06	92	0,166	133	117	80	0	1,5E+05
CuO NPer natriumsitrat 100 ng/L	0,062	108	2,5E+06	25	0,069	102	84	38	0	1,2E+05
CuO NPer natriumsitrat 1 µg/L	0,062	775	1,8E+07	201	0,300	114	100	88	0	2,1E+05

Vedlegg 3.5 resultater for 100 ng/L CeO₂NPer <50 nm fra pulver og 100 ng/L CeO₂ NPer 30-50 nm fra leverandørsuspensjon fortynnet i Milli-Q® vann eller 2,5% eddiksyre.

Prøvetype	TE	Antall partikler	Partikkelantall-konsentrasjon (partikler/L)	Masse-konsentrasjon (ng/L)	Total-konsentrasjon (ppb)	Snitt størrelse (nm)	Median størrelse (nm)	Hyppigst størrelse (nm)	Grunnlinje (CPS)	Størrelsebestemmelsesgrense (CPS)
CeO ₂ pulver <50 nm	0,071	176	3,6E+06	9,9	0,010	58	44	18	0	1,1E+05
CeO ₂ pulver <50 nm	0,071	138	2,8E+06	7,3	0,007	61	51	38	0	1,1E+05
CeO ₂ suspensjon 30-50 nm 2.5% eddiksyre	0,074	2099	4,1E+07	41	0,043	49	40	26	0	2,8E+05
CeO ₂ suspensjon 30-50 nm 2.5% eddiksyre	0,074	2407	4,7E+07	40	0,043	48	39	24	0	2,8E+05
CeO ₂ suspensjon 30-50 nm	0,071	2576	5,2E+07	44	0,045	49	42	28	0	3,9E+05
CeO ₂ suspensjon 30-50 nm	0,071	2822	5,7E+07	49	0,050	49	42	28	0	3,9E+05
CeO ₂ suspensjon 30-50 nm	0,072	2943	5,9E+07	53	0,056	51	43	30	0	4,6E+05
CeO ₂ suspensjon 30-50 nm	0,072	2771	5,6E+07	50	0,053	51	43	30	0	4,6E+05
CeO ₂ suspensjon 30-50 nm	0,072	2748	5,5E+07	53	0,055	52	44	30	0	4,6E+05
CeO ₂ suspensjon 30-50 nm 75 dager gammel	0,064	1342	3,0E+07	32	0,032	54	48	36	0	3,3E+05
CeO ₂ suspensjon 30-50 nm 75 dager gammel	0,064	1255	2,8E+07	35	0,036	57	52	42	0	3,3E+05
CeO ₂ suspensjon 30-50 nm 75 dager gammel	0,064	1381	3,1E+07	33	0,033	55	49	48	0	3,3E+05

Vedlegg 3.6 resultater for blåskjellprøver, ustabiliserte og 2,5% eddiksyre-stabiliserte CeO₂ NPer 30-50 nm spiket i blåskjell (slutt konsentrasjon 100 ng/L)

Prøvetype	TE	Antall partikler	Partikkelantall-konsentrasjon (partikler/L)	Masse-konsentrasjon (ng/L)	Total-konsentrasjon (ppb)	Snitt størrelse (nm)	Median størrelse (nm)	Hyppigst størrelse (nm)	Grunnlinje (CPS)	Størrelsebestemmelsesgrense (CPS)
Blåskjellblank lok.D	0,064	761	1,7E+07	9,2	0,167	43	39	36	40000	1,1E+06
Blåskjellblank lok.D	0,064	844	1,9E+07	9,0	0,167	42	38	36	40000	1,1E+06
Blåskjellblank lok.D	0,064	441	9,9E+06	4,2	0,121	43	39	36	40000	1,1E+06
CeO ₂ NPer spiket før enzymbehandling i matriks	0,064	799	1,8E+07	22	0,120	56	47	36	40000	1,1E+06
CeO ₂ NPer spiket før enzymbehandling i matriks	0,064	913	2,1E+07	19	0,128	54	46	36	40000	1,1E+06
CeO ₂ NPer spiket før enzymbehandling i matriks	0,064	2017	4,5E+07	27	0,139	46	41	36	40000	1,1E+06
CeO ₂ NPer spiket etter enzymbehandling i matriks	0,064	1199	2,7E+07	23	0,149	52	44	36	40000	1,1E+06
CeO ₂ NPer spiket etter enzymbehandling i matriks	0,064	850	1,9E+07	19	0,130	55	47	36	40000	1,1E+06
CeO ₂ NPer spiket etter enzymbehandling i matriks	0,064	960	2,2E+07	24	0,119	56	49	36	40000	1,1E+06
CeO ₂ suspensjon 100 ng/L	0,064	1043	2,3E+07	31	0,032	61	55	44	0	1,1E+06
CeO ₂ suspensjon 100 ng/L	0,064	1018	2,3E+07	35	0,036	64	58	42	0	1,1E+06
CeO ₂ suspensjon 100 ng/L	0,064	1084	2,4E+07	32	0,033	62	55	48	0	1,1E+06
Blåskjellblank lok.C	0,065	383	8,5E+06	3,0	0,146	41	38	36	40000	1,2E+06
Blåskjellblank lok.C	0,065	498	1,1E+07	4,1	0,135	42	38	36	40000	1,2E+06
Blåskjellblank lok.C	0,065	456	1,0E+07	4,2	0,131	43	38	36	40000	1,2E+06
CeO ₂ NPer spiket før enzymbehandling i matriks	0,065	1258	2,8E+07	25	0,141	54	47	36	40000	1,2E+06
CeO ₂ NPer spiket før enzymbehandling i matriks	0,065	1614	3,6E+07	30	0,158	53	46	36	40000	1,2E+06
CeO ₂ NPer spiket før enzymbehandling i matriks	0,065	1474	3,3E+07	30	0,154	53	45	36	40000	1,2E+06
CeO ₂ NPer spiket etter enzymbehandling i matriks	0,065	1699	3,8E+07	32	0,187	53	44	36	40000	1,2E+06
CeO ₂ NPer spiket etter enzymbehandling i matriks	0,065	1447	3,2E+07	29	0,154	54	46	36	40000	1,2E+06
CeO ₂ NPer spiket etter enzymbehandling i matriks	0,065	977	2,2E+07	20	0,112	54	48	38	40000	1,2E+06
CeO ₂ suspensjon 100 ng/L	0,064	1062	2,4E+07	31	0,032	61	55	36	0	1,1E+06
CeO ₂ suspensjon 100 ng/L	0,064	1036	2,3E+07	35	0,036	63	58	42	0	1,1E+06
CeO ₂ suspensjon 100 ng/L	0,064	1102	2,5E+07	32	0,033	61	55	48	0	1,1E+06

Blåskjellblank lok.D	0,074	308	6,0E+06	3,1	0,087	42	38	34	40000	9,7E+05
CeO ₂ NPer spiket før enzymbehandling i matriks	0,074	1805	3,5E+07	31	0,139	53	46	36	40000	9,7E+05
CeO ₂ NPer spiket før enzymbehandling i matriks	0,074	1976	3,9E+07	38	0,161	53	46	36	40000	9,7E+05
CeO ₂ suspensjon 100 ng/L 2.5% eddiksyre	0,074	1370	2,7E+07	40	0,051	62	54	36	0	9,7E+05
CeO ₂ suspensjon 100 ng/L 2.5% eddiksyre	0,074	1528	3,0E+07	39	0,051	60	53	40	0	9,7E+05

Vedlegg 3.7 resultater for 100 ng/L ZrO₂ NPer ustabilisert, stabilisert ved stamsuspensjonen med 0,1% og 0,5% natriumsitrat og videre fortynnet i Milli-Q® vann, og stabilisert ved stamsuspensjonen og fortynnet i 0,1% natriumsitrat fram til analyse.

Prøvetype	TE	Antall partikler	Partikkelantall-konsentrasjon (partikler/L)	Masse-konsentrasjon (ng/L)	Total-konsentrasjon (ppb)	Snitt størrelse (nm)	Median størrelse (nm)	Hyppigst størrelse (nm)	Grunnlinje (CPS)	Størrelsebestemmelsesgrense (CPS)
ZrO ₂ NPer ustabilisert	0,070	225	4,7E+06	44	0,045	105	89	98	0	9,5E+04
ZrO ₂ NPer ustabilisert	0,070	268	5,6E+06	42	0,042	87	66	28	0	4,3E+04
ZrO ₂ NPer ustabilisert	0,070	224	4,6E+06	40	0,041	93	75	30	0	5,7E+04
ZrO ₂ NPer ustabilisert	0,076	185	3,5E+06	22	0,022	89	73	32	0	6,7E+04
ZrO ₂ NPer ustabilisert	0,076	275	5,2E+06	36	0,036	98	84	32	0	6,7E+04
ZrO ₂ NPer ustabilisert	0,076	168	3,2E+06	23	0,023	97	80	110	0	6,5E+04
ZrO ₂ NPer stabilisert ved stamsuspensjon 0,5 % natriumsitrat	0,070	775	1,6E+07	40	0,042	75	65	46	0	1,5E+05
ZrO ₂ NPer stabilisert ved stamsuspensjon 0,1 % natriumsitrat	0,068	865	1,8E+07	47	0,051	76	66	42	0	1,8E+05
ZrO ₂ NPer stabilisert ved stamsuspensjon 0,1 % natriumsitrat	0,070	695	1,4E+07	34	0,035	74	64	46	0	1,2E+05
ZrO ₂ NPer stabilisert ved stamsuspensjon 0,1 % natriumsitrat	0,070	717	1,5E+07	31	0,032	71	61	52	0	1,2E+05

ZrO ₂ NPer stabilisert ved stamsuspensjon 0,1 % natriumsitrat	0,067	691	1,5E+07	40	0,041	76	66	48	0	1,2E+05
ZrO ₂ NPer stabilisert ved stamsuspensjon 0,1 % natriumsitrat	0,076	446	8,5E+06	49	0,049	92	78	34	0	8,3E+04
ZrO ₂ NPer stabilisert ved stamsuspensjon 0,1 % natriumsitrat	0,076	459	8,7E+06	55	0,055	96	79	46	0	8,3E+04
ZrO ₂ NPer stabilisert ved stamsuspensjon 0,1 % natriumsitrat	0,076	513	9,7E+06	50	0,050	90	78	42	0	8,3E+04
ZrO ₂ NPer stabilisert ved stamsuspensjon og fortynnet i 0,1% natriumsitrat	0,076	932	1,8E+07	68	0,123	86	74	46	10000	1,7E+05
ZrO ₂ NPer stabilisert ved stamsuspensjon og fortynnet i 0,1% natriumsitrat	0,076	952	1,8E+07	67	0,124	84	72	50	10000	1,7E+05
ZrO ₂ NPer stabilisert ved stamsuspensjon og fortynnet i 0,1% natriumsitrat	0,076	963	1,8E+07	75	0,132	88	75	46	10000	1,7E+05
ZrO ₂ NPer stabilisert ved stamsuspensjon og fortynnet i 0,1% natriumsitrat	0,064	1420	3,2E+07	77	0,268	77	68	48	10000	3,0E+05
ZrO ₂ NPer stabilisert ved stamsuspensjon og fortynnet i 0,1% natriumsitrat	0,064	1308	2,9E+07	74	0,235	77	67	44	10000	3,0E+05
ZrO ₂ NPer stabilisert ved stamsuspensjon og fortynnet i 0,1% natriumsitrat	0,064	1158	2,6E+07	57	0,203	75	65	46	10000	3,0E+05

Vedlegg 3.8 resultater for blåskjellprøver, 100 ng/L 0,1% natriumsitrat-stabiliserte ZrO₂ NPer og 100 ng/L 0,1% natriumsitrat-stabiliserte ZrO₂ NPer spiket i blåskjell.

Prøvetype	TE	Antall partikler	Partikkelantall-konsentrasjon (partikler/L)	Masse-konsentrasjon (ng/L)	Total-konsentrasjon (ppb)	Snitt størrelse (nm)	Median størrelse (nm)	Hyppigst størrelse (nm)	Grunnlinje (CPS)	Størrelsebestemmelsesgrense (CPS)
Blåskjellblank lok.D	0,070	77	1,6E+06	1,7	0,089	58	49	42	10000	1,8E+05
ZrO ₂ NPer spiket før enzymbehandling i matriks	0,070	1197	2,5E+07	54	0,141	73	64	46	10000	1,8E+05
ZrO ₂ NPer 100 ng/L	0,070	720	1,5E+07	39	0,042	77	68	46	10000	1,8E+05
Blåskjellblank lok.D	0,067	70	1,5E+06	2,9	0,091	66	55	48	10000	2,3E+05
ZrO ₂ NPer spiket før enzymbehandling i matriks	0,067	1182	2,5E+07	54	0,141	75	66	48	10000	2,3E+05
ZrO ₂ NPer 100 ng/L	0,067	660	1,4E+07	46	0,048	84	71	68	10000	2,3E+05
Blåskjellblank lok.C	0,065	167	3,7E+06	5,7	0,124	62	51	46	10000	3,7E+05
Blåskjellblank lok.C	0,065	179	4,0E+06	6,6	0,132	61	52	46	10000	3,7E+05
Blåskjellblank lok.C	0,065	188	4,2E+06	3,0	0,128	57	52	46	10000	3,7E+05
ZrO ₂ NPer spiket før enzymbehandling i matriks	0,065	807	1,8E+07	68	0,190	86	71	46	10000	3,7E+05
ZrO ₂ NPer spiket før enzymbehandling i matriks	0,065	770	1,7E+07	63	0,190	85	70	46	10000	3,7E+05
ZrO ₂ NPer spiket før enzymbehandling i matriks	0,065	710	1,6E+07	86	0,216	88	66	46	10000	3,7E+05
ZrO ₂ NPer spiket etter enzymbehandling i matriks	0,065	452	1,0E+07	48	0,176	78	59	46	10000	3,7E+05
ZrO ₂ NPer spiket etter enzymbehandling i matriks	0,065	459	1,0E+07	62	0,188	84	64	50	10000	3,7E+05
ZrO ₂ NPer spiket etter enzymbehandling i matriks	0,065	337	7,5E+06	42	0,158	82	62	46	10000	3,7E+05
ZrO ₂ NPer 100 ng/L	0,064	766	1,7E+07	65	0,157	86	73	46	10000	3,3E+05
ZrO ₂ NPer 100 ng/L	0,064	927	2,1E+07	77	0,169	85	74	56	10000	3,3E+05
ZrO ₂ NPer 100 ng/L	0,064	798	1,8E+07	64	0,136	85	74	66	10000	3,3E+05
Reagensblank	0,065	0	0,0E+00	0,0	0,070	0	0	0	10000	3,7E+05
Reagensblank	0,065	1	2,2E+04	0,0	0,079	62	62	64	10000	3,7E+05
Reagensblank	0,065	0	0,0E+00	0,0	0,086	0	0	0	10000	3,7E+05
Blåskjellblank lok.D	0,064	418	9,4E+06	10	0,258	52	46	44	10000	3,3E+05
Blåskjellblank lok.D	0,064	1505	3,4E+07	25	0,267	54	48	44	10000	3,3E+05
Blåskjellblank lok.D	0,064	187	4,2E+06	14	0,186	65	53	46	10000	3,3E+05
ZrO ₂ NPer spiket før enzymbehandling i matriks*	0,064	474	1,1E+07	28	0,152	79	72	46	10000	3,3E+05

ZrO ₂ NPer spiket før enzymbehandling i matriks*	0,064	406	9,1E+06	27	0,149	81	68	44	10000	3,3E+05
ZrO ₂ NPer spiket før enzymbehandling i matriks*	0,064	391	8,8E+06	25	0,170	79	65	44	10000	3,3E+05
ZrO ₂ NPer spiket etter enzymbehandling i matriks*	0,064	310	7,0E+06	25	0,258	77	64	44	10000	3,3E+05
ZrO ₂ NPer spiket etter enzymbehandling i matriks*	0,064	283	6,4E+06	23	0,267	76	60	44	10000	3,3E+05
ZrO ₂ NPer spiket etter enzymbehandling i matriks*	0,064	419	9,4E+06	43	0,186	82	65	44	10000	3,3E+05

* Avvikende verdier ble mistenkt til å komme av feil i prøveopparbeiding.

Vedlegg 3.9 resultater for reagensblanker med enzymer og Ce i blåskjell fra fire ulike lokasjoner.

Prøvetype	TE	Antall partikler	Partikkelantall-konsentrasjon (partikler/g)	Massekonsentrasjon (ng/g)	Total-konsentrasjon (ng/g)	Gjennomsnitt størrelse (nm)	Median størrelse (nm)	Hyppigst størrelse (nm)	Grunnlinje (CPS)	Størrelsebestemmelsesgrense (CPS)
Reagensblank	0,065	0	0	0	9,45	0	0	0	0	7,3E+05
Reagensblank	0,065	0	0	0	10,5	0	0	0	0	7,3E+05
Reagensblank	0,065	0	0	0	11,4	0	0	0	0	7,3E+05
Lokasjon A	0,065	102	2,3E+06	0,41	18,7	34	31	30	20000	7,3E+05
Lokasjon A	0,065	105	2,3E+06	0,59	19,1	34	31	30	20000	7,3E+05
Lokasjon A	0,065	117	2,6E+06	0,45	20,3	34	31	30	20000	7,3E+05
Lokasjon B	0,065	182	4,1E+06	1,66	39,5	40	35	34	30000	1,2E+06
Lokasjon B	0,065	166	3,7E+06	1,48	36,4	41	37	34	30000	1,2E+06
Lokasjon B	0,065	181	4,0E+06	1,02	37,1	39	36	34	30000	1,2E+06
Lokasjon C	0,065	213	4,7E+06	1,30	59,5	38	35	34	40000	1,2E+06
Lokasjon C	0,065	264	5,9E+06	1,69	53,5	39	36	34	40000	1,2E+06
Lokasjon C	0,065	241	5,4E+06	1,73	52,6	40	36	34	40000	1,2E+06
Lokasjon D	0,064	317	7,1E+06	3,52	67,1	43	38	36	40000	1,2E+06
Lokasjon D	0,064	342	7,7E+06	3,37	65,8	42	38	36	40000	1,2E+06
Lokasjon D	0,064	186	4,2E+06	1,60	48,8	43	39	36	40000	1,2E+06
Lokasjon D*	0,074	117	2,3E+06	1,14	32,5	43	38	36	30000	1,2E+06

*Er fra en annen samleprøve enn de andre prøvene fra lokasjon D.

Vedlegg 3.10 Resultater for reagensblanker med enzymer og Zr i blåskjell.

Prøvetype	TE	Antall partikler	Partikkelantall-konsentrasjon (partikler/g)	Masse-konsentrasjon (ng/g)	Total-konsentrasjon (ng/g)	Snitt størrelse (nm)	Median størrelse (nm)	Hyppigst størrelse (nm)	Grunnlinje (CPS)	Størrelsebestemmelsesgrense (CPS)
Reagensblank	0,065	0	0	0,000	0,026	0	0	0	10000	2,3E+05
Reagensblank	0,065	1	1,1E+04	0,006	0,029	54	54	54	10000	2,3E+05
Reagensblank	0,065	1	2,2E+04	0,004	0,032	36	36	38	10000	2,3E+05
Lokasjon A	0,065	49	2,2E+06	0,389	0,036	44	42	36	10000	2,5E+05
Lokasjon A	0,065	38	1,7E+06	0,369	0,036	44	39	34	10000	2,5E+05
Lokasjon A	0,065	53	2,4E+06	1,011	0,040	48	42	40	10000	2,5E+05
Lokasjon B	0,065	32	1,4E+06	0,569	0,029	44	39	34	10000	2,3E+05
Lokasjon B	0,065	32	1,4E+06	3,307	0,032	54	41	36	10000	2,3E+05
Lokasjon B	0,065	24	1,1E+06	0,211	0,027	43	40	34	10000	2,3E+05
Lokasjon C	0,065	96	4,3E+06	2,175	0,046	51	43	40	10000	3,3E+05
Lokasjon C	0,065	104	4,6E+06	2,444	0,048	50	44	38	10000	3,3E+05
Lokasjon C	0,065	104	4,6E+06	1,146	0,047	48	43	40	10000	3,3E+05
Lokasjon D	0,064	65	2,9E+06	3,047	0,094	58	48	46	20000	4,4E+05
Lokasjon D	0,064	252	1,1E+07	4,936	0,096	52	47	42	20000	4,4E+05
Lokasjon D	0,064	59	2,7E+06	4,850	0,068	64	51	46	20000	4,4E+05
Lokasjon D*	0,067	35	7,5E+05	1,075	0,033	57	47	38	10000	2,2E+05
Lokasjon D*	0,070	32	6,7E+05	0,575	0,031	52	43	36	10000	1,8E+05

*Er fra en annen samleprøve enn de andre prøvene fra lokasjon D.

Vedlegg 3.11 CuO instrumentblank resultater samt standardavvik (SD), deteksjonsgrense (LOD) og kvantifiseringsgrense (LOQ) beregnet fra instrumentblanker.

Prøvetype	N	Parameter	Partikkelantall-			
			Antall partikler	konsentrasjon (partikler/L)	Massekonsentrasjon (ng/L)	Totalkonsentrasjon (ppb)
Instrumentblank	9	Gjennomsnitt	2	3,9E+04	0,04	0,06
		SD	2	5,0E+04	0,11	0,02
		LOD	8	1,9E+05	0,38	0,12
		LOQ	24	5,6E+05	1,13	0,36

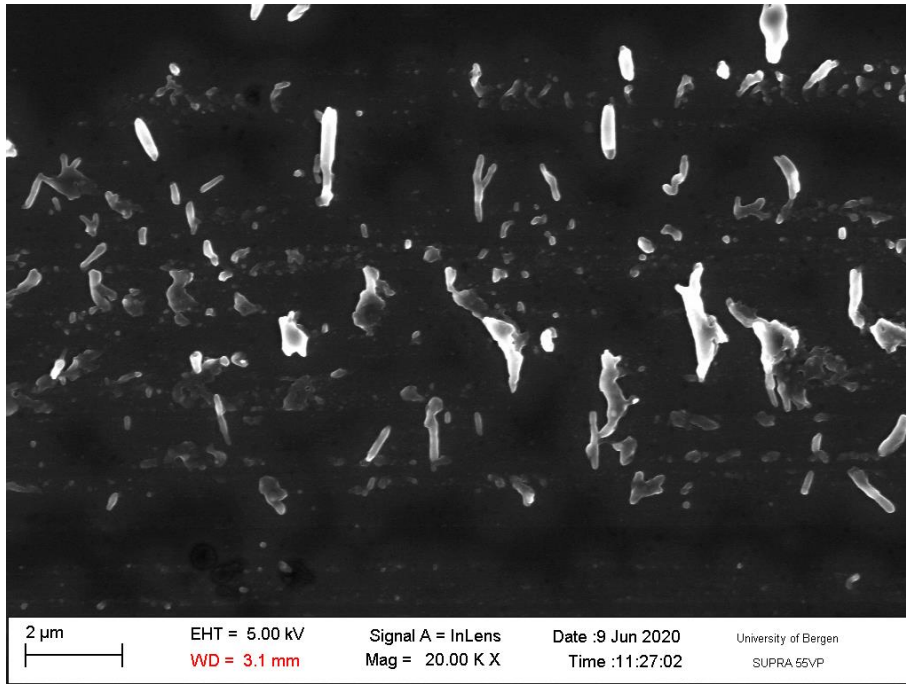
Vedlegg 3.12 CeO₂ instrumentblank resultater samt standardavvik (SD), deteksjonsgrense (LOD) og kvantifiseringsgrense (LOQ) beregnet fra instrumentblanker.

Prøvetype	N	Parameter	Partikkelantall-			
			Antall partikler	konsentrasjon (partikler/L)	Massekonsentrasjon (ng/L)	Totalkonsentrasjon (ppb)
Instrumentblank	17	Gjennomsnitt	1	1,7E+04	0,005	0,0003
		SD	1	3,1E+04	0,012	0,0010
		LOD	5	1,2E+05	0,044	0,0034
		LOQ	16	3,5E+05	0,132	0,0102

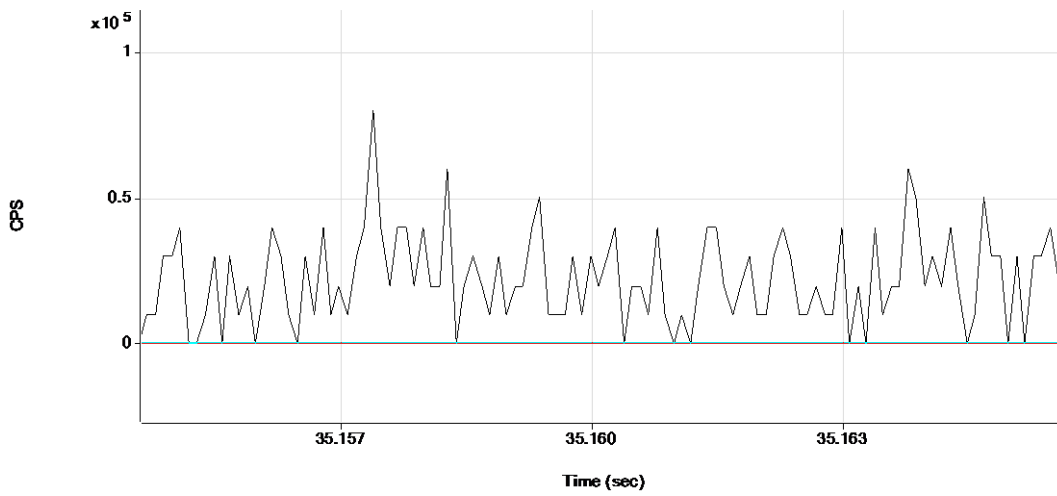
Vedlegg 3.13 ZrO₂ natriumsitratblank og instrumentblank resultater samt standardavvik (SD), deteksjonsgrense (LOD) og kvantifiseringsgrense (LOQ) beregnet fra instrumentblanker.

Prøvetype	N	Parameter	Partikkelantall-			
			Antall partikler	konsentrasjon (partikler/L)	Massekonsentrasjon (ng/L)	Totalkonsentrasjon (ppb)
Instrumentblank	17	Gjennomsnitt	8	1,7E+05	0,06	0,001
		SD	9	2,0E+05	0,05	0,001
		LOD	36	7,7E+05	0,22	0,005
		LOQ	108	2,3E+06	0,66	0,014
0,1% natriumsitratblank	2	Gjennomsnitt	40	8,1E+05	1,48	0,132
natriumsitratblank*			1	1,9E+04	0,00	0,001

* Tilsvarende å fortynne en 0,1% natriumsitrat-stabilisert 50 mg/L NP-stamsuspensjon fram til en 100 ng/L prøve.



Vedlegg 4.1 CeO_2 NPer <50 nm 50 mg/L laget fra NP-pulver analysert med SEM (ZEISS SUPRA 55VP)



Vedlegg 5.1 tidsoppløst råsignalplott av CuO NPer <50 nm 1 μ g/L i 0,1% sitronsyre.